MONOKLONALE ANTIKÖRPER GEGEN KERNPROTEINE VON DROSOPHILA MELANOGASTER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard–Karls–Universität Tübingen

vorgelegt
von

HARALD SAUMWEBER
aus Memmingen

1980

MONOKLONALE ANTIKÖRPER GEGEN KERNPROTEINE VON DROSOPHILA MELANOGASTER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard–Karls–Universität Tübingen

vorgelegt
von
HARALD SAUMWEBER
aus Memmingen

1980

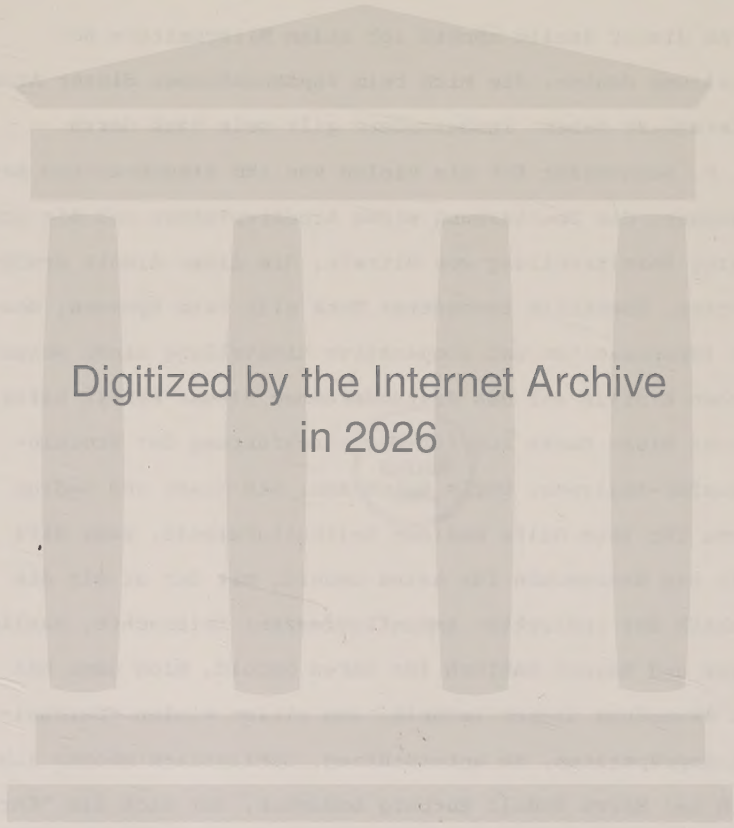
UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 27. November 1980

Dekan:	Prof. Dr. A. Hager
1. Berichterstatter:	Dr.rer.nat.habil. Manfred Renz
2. Berichterstatter:	Dr.agr.o.Prof.Wilhelm Seyffert

Die vorliegende Arbeit wurde vom 1.12.1978 bis zum 4.6.1980 am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für physikalische Biologie, in Tübingen durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung danken, die mich beim Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. F. Bonhoeffer für die vielen von ihm eingebrachten Anregungen, die Überlassung eines Arbeitsplatzes und die großzügige Bereitstellung von Mitteln, die diese Arbeit ermöglichten. Ebenfalls besonderer Dank gilt Pete Symmons, dessen Ideenreichtum und kooperative Einstellung einen wesentlichen Einfluß auf das Zustandekommen dieser Arbeit hatte. Werner Risau danke ich für die Durchführung der Proteintransfer-Analysen, Doris Heinemann, Ute Moser und Gudrun Thoma für ihre Hilfe bei der Zellkulturarbeit. Hans Will gilt ein Dankeschön für seine Geduld, mit der er mir die Technik der indirekten Immunfluoreszenz beibrachte, Marlies Mayer und Rainer Kabisch für deren Geduld, mich dann bei der Anwendung dieser Technik, den vielen vielen Speicheldrüsenpräparaten, zu unterstützen. Schließlich möchte ich mich bei Herrn Rudolf Burberg bedanken, der mich als "Chromosomenspezialist" bei der vorläufigen Auswertung der Chromosomenpräparate unterstützte.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0081

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. ABKÜRZUNGEN	5
3. MATERIAL UND METHODEN	6
3.1. Zellen und Zellkulturbedingungen	6
3.1.1. Kulturmedien	6
3.1.2. Myelomzellen	6
3.1.3. Fusion der Zellen	7
3.1.4. Klonierung	8
3.1.5. Kultivierung der Hybridzellen	10
3.1.6. Drosophila K_c-Zellkulturen	10
3.2. Antigendarstellung	10
3.2.1. Gesamtkernprotein	10
3.2.2. Fraktionierung der Kernproteine auf Biogel HT	11
3.3. Immunologische Techniken	12
3.3.1. Immunisierung	12
3.3.1.1. Mäuse	12
3.3.1.2. Kaninchen	12
3.3.2. Darstellung von Antikörperreagenzien	13
3.3.2.1. Darstellung von Kaninchen-Anti-Maus-Fabγ-Antikörpern (KAM-Fab)	13
3.3.2.1.1. Darstellung von Maus-IgG-Fab-Fragmenten	13
3.3.2.1.2. Reinigung von Kaninchen-Anti-Maus-Fabγ-Antikörpern (KAM-Fab) aus Kaninchenseren	14
3.3.2.2. Kopplung von Proteinen an Sepharose 4B	15
3.3.2.3. Jodierung von Proteinen	15
3.3.3. Immunologische Nachweismethoden	15
3.3.3.1. Radioimmuntest	15
3.3.3.2. Ouchterlony-Doppelimmundiffusion	16
3.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz	17
3.3.4.1. Fixierungsmethoden und Herstellung von Speicheldrüsen-Quetschpräparaten	17
3.3.4.2. Anfärbung und Photographie	18

Seite

3.3.5. Immunpräzipitation mit Kaninchen-Anti-Maus-Fabγ gekoppelt an Sepharose 4B (KAM-Fab-Sepharose) 19

3.3.6. Nachweis der Antigene nach Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen 20

3.4. Elektrophorese und analytische Nachweismethoden 21

3.5. Chemikalien 22

4. ERGEBNISSE 23

4.1. Darstellung der Antigene 23

4.2. Etablierung der Zellinien 26

4.2.1. Immunantwort 26

4.2.2. Ergebnisse auf der Ebene der Zellinien 30

4.3. Monoklonale Antikörper gegen Kernproteine von Drosophila melanogaster 33

4.3.1. Monoklonale Antikörper gegen Kernmembranantigene 33

4.3.2. Monoklonale Antikörper gegen Antigene des Nucleolus 36

4.3.3. Monoklonale Antikörper gegen chromosomale Proteine 36

4.3.3.1. Klasse 1: Monoklonale Antikörper gegen Proteine in aktiven Bereichen (Puffs und prominente Interbanden) 37

4.3.3.2. Klasse 2: Monoklonale Antikörper gegen Proteine in inaktiven Bereichen (Banden) 43

4.3.3.3. Klasse 3: Monoklonale Antikörper gegen Antigene in Interbanden 45

4.3.3. Zusammenfassung der mit monoklonalen Antikörpern erhaltenen Ergebnisse 46

5. DISKUSSION 49

6. ZUSAMMENFASSUNG 66

7. LITERATUR 67

LEBENSLAUF 72

1. EINLEITUNG

Die genetische Information der Eukaryonten ist in deren Zellkern als Chromatin, einem stabilen Komplex mit RNS, Histonen und Nichthiston-Proteinen, abgepackt. Den Histonen in diesem Komplex werden dabei hauptsächlich strukturelle Funktionen zugeschrieben. In grundlegenden Strukturuntereinheiten, den Nukleosomen, sind jeweils ungefähr 160 Basenpaare DNS um ein sogenanntes "core" aus je zweien der kleineren Histonmoleküle (H2A, H2B, H3, H4) gewunden. Diese Nukleosomen sind untereinander durch DNS-Stücke einer Länge von ungefähr 40 Basenpaaren verbunden, die als "spacer" oder "linker" bezeichnet werden. An diese Regionen ist möglicherweise Histon H1 assoziiert. Diese im Elektronenmikroskop mit einer Dicke von 110 Å nachweisbare Faser wird dann unter dem Einfluß von Histon H1 (Finch und Klug, 1976; Hozier et al. 1977) und Nichthiston-Proteinen (Benyajaiti und Worcel, 1976; Paulson und Laemmli, 1977) in Einheiten höherer Strukturordnung abgefaltet.

Im Gegensatz zu den Histonen sind die übrigen Proteine des Chromatins, zusammengefaßt als Nichthiston-Proteine bezeichnet, hinsichtlich ihrer Zusammensetzung äußerst heterogen, und es ist nur wenig über ihre Funktionen bekannt. Ihr Gewichtsanteil im Chromatin bei verschiedenen Spezies und Geweben beträgt 30 bis 120 % des Gewichts der Histone (Elgin und Bonner, 1970). Die Molekulargewichte einzelner Polypeptidkomponenten reichen von 10 000 bis über 100 000 Dalton (Elgin und Bonner, 1970) mit isoelektrischen Punkten

zwischen pH4 und 9 (Elgin und Bonner, 1972). Peterson und McConkey (1976) konnten bei HeLa-Zellkernen unter Verwendung zweidimensionaler Gelsysteme 450 Polypeptid-Komponenten auftrennen. In dieser Klasse von Proteinen findet sich eine Reihe von Enzymen (Übersichtsartikel von Elgin und Weintraub, 1975) und Strukturproteinen (Benyajaiti und Worcel, 1976; Paulson und Laemmli, 1977). Es gibt aber auch Hinweise, wonach einige der Nichthistonproteine direkt am Prozeß der Genexpression (Parker und Roeder, 1977; Weil et al., 1979a,b) an der Entstehung (Ashburner, 1974) und Aufrechterhaltung (Weisbrod und Weintraub, 1980) eines aktiven Genzustandes beteiligt sein könnten.

Es war seit langem von Interesse, mit geeigneten Methoden die Verteilung von Nichthiston-Proteinen im Chromatin und deren Änderung bei Veränderung der Stoffwechsellage der Zelle verfolgen zu können. Als besonders leistungsfähig erwies sich in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren die Methode der indirekten Immunfluoreszenz an eukaryotischen Chromosomen (Scott und Sommerville, 1974; Silver und Elgin, 1976). Insbesondere an polytänen Chromosomen von Drosophila melanogaster konnte mit Antiseren gegen Nichthiston-Proteinfraktionen (Silver und Elgin, 1977; Mayfield et al., 1978; Will und Bautz, 1980), isolierte Nichthiston-Proteine (Alfageme et al., 1976; Silver und Elgin, 1978a) und RNS-Polymerase II (Plagens et al., 1976) eine spezifische Verteilung bestimmter Nichthiston-Proteine gezeigt werden. In einigen Fällen konnten Veränderungen in der Verteilung dieser Proteine

auf Grund veränderter Stoffwechsellage des Organismus (Hitzeschockbehandlung) nachgewiesen werden (Greenleaf et al., 1978; Silver und Elgin, 1978b).

Die potentiellen Möglichkeiten dieser Methode werden jedoch durch die bisherige Praxis der Antikörpergewinnung aus den Seren immunisierter Tiere eingeschränkt. Diese Einschränkungen beruhen auf der Notwendigkeit, hochgereinigtes Antigen in ausreichenden Mengen bereitzustellen; ausreichend, um Antiseren mit genügend hohem Antikörpertiter zu erzielen, hochgereinigt, um Artefakte bei der Lokalisierung definierter Antigene durch mitenthaltene geringfügige Verunreinigungen zu vermeiden. Insbesondere bei seltener vorkommenden Nichthiston-Proteinen dürften beide Forderungen schwer zu erfüllen sein.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war das Interesse an der Funktionsweise möglicher genregulierender Proteine, Wege zu finden, um deren Verteilung in der indirekten Immunfluoreszenz an eukaryotischen Chromosomen studieren zu können. Da diese Proteine - zieht man bei Prokaryonten bekannte Beispiele zum Vergleich heran (Gilbert und Müller-Hill, 1966; auch: Lin und Riggs, 1973) - eher in der Klasse der selteneren Nichthiston-Proteine zu finden sind, wurde in dieser Arbeit eine neue Methode zur Gewinnung spezifischer Antikörper eingesetzt, mit der es möglich schien, oben erwähnte Schwierigkeiten zu umgehen.

Köhler und Milstein beschrieben 1975 eine Methode zur Herstellung permanenter, klonaler Zellkulturen aus Lympho-

zyten, die noch in der Lage waren, spezifische Antikörper zu sezernieren. Seither wurden gegen eine Reihe verschiedener Antigene monoklonale Antikörper erzeugt (vgl. Übersichtsartikel Melchers et al., 1978). Unter anderem wurde diese Technik auch zur Charakterisierung einzelner, in komplexen Mischungen enthaltener Zelloberflächen-Komponenten eingesetzt (Williams et al., 1977).

Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit zur Erzeugung spezifischer Antikörper gegen Kernproteine von Drosophila melanogaster übernommen. An Stelle gereinigter Proteine wurden gesamte Kerne oder grob über Hydroxylapatit fraktionierte Kernproteine der D.melanogaster Zellinie K_c zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt. Aus den Milzen der Tiere wurden nach der von Köhler und Milstein (1975) beschriebenen Methode permanente Zellinien etabliert, die Antikörper gegen Komponenten der zur Immunisierung eingesetzten Proteinmischungen sezernierten. Von den erhaltenen 761 Zellinien sezernierten 58 Linien Antikörper, die eine selektive und reproduzierbare indirekte Immunfluoreszenz-Anfärbung polytäner Chromosomen von D.melanogaster-Speicheldrüsenzellen ergaben. Fünf Zellinien sezernierten Antikörper, die nach den Ergebnissen in der indirekten Immunfluoreszenz gegen Kernmembranproteine gerichtet waren und eine Linie solche, die in der indirekten Immunfluoreszenz den Nucleolus anfärbte. 12 der Immunfluoreszenz-positiven Zellinien wurden kloniert und ihre Antikörper wurden näher charakterisiert. In 11 Fällen konnte das zugehörige Antigen nach seinem Molekulargewicht in SDS-Gelen identifiziert werden.

2. ABKÜRZUNGEN

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
DMEM	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DPS	Dulbecco's phosphatgepufferte Saline
EDTA	Äthylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
Fabγ	"Fragment Antibody" der IgG-Fraktion
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthaltende Selektionsmedien
IE	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
KAM Fab	Kaninchen-Anti-Maus-Fabγ-Antikörper
KP	Kaliumphosphatpuffer
NaP	Natriumphosphatpuffer
NS-1	Myelom-Zellinie P3-NS1/1-Ag4-1
65/3	Myelom-Zellinie P3-X63-Ag8-65/3
PEG	Polyäthylenglycol
PS	Phosphatgepufferte Saline
PVC	Polyvinylchlorid
RNP	"ribonuclear proteins"
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
SDS	"Sodium dodecyl sulfate"
t-RNS	"transfer"-Ribonukleinsäure
W	Watt

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Zellen und Zellkulturbedingungen

3.1.1. Kulturmedien

Die zur Kultivierung der Zellen verwendeten Medien wurden mit folgenden Abkürzungen bezeichnet:

DMEM, Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium (Dulbecco und Freeman, 1959), wurde unter Zusatz von 10 % foetalem Kälberserum (FKS), 20 µM β-Mercaptoaethanol und je 100 IE Penicillin und Streptomycin hergestellt.

RPMI 1640, Roswell Park Memorial Institute Medium, wurde von Flow Laboratories bezogen und unter Zusatz von 20 % FKS (Flow Laboratories oder Seromed), 10 mM Natriumpyruvat, 20 µM ß-Mercaptoaethanol und je 100 IE Penicillin und Streptomycin verwendet.

HAT-RPMI wurde unter Zusatz von 19,9 mg Hypoxanthin, 42 mg Thymidin und 0,27 Aminopterin zu 1000 ml RPMI 1640 zur Selektion von Hybridomzellen nach Littlefield (1964) verwendet.

D20 Medium nach Echalier und Ohanessian (1970) wurde zur Kultivierung der Drosophila K_c-Zellen eingesetzt.

3.1.2. Myelomzellen

Die Myelomzellinien P3-NS1/1-Ag4-1 (Köhler et al.,1976), freundlicherweise von Dr. Milstein zur Verfügung gestellt, sowie P3-X63-Ag8-65/3(Kearney et al.,1979),die mir dankenswerterweise Dr. Hämmerling überließ, wurden in RPMI 1640 kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von

10^5 bis 10^6 Zellen pro ml in 10 ml Kulturen in Petrischalen (bakteriologisch, Greiner) in einem Brutschrank bei 37°C, 4 % CO_2 unter feuchter Atmosphäre gehalten. Diese Zellinien werden fortan als NS-1 bzw. 65/3 bezeichnet.

3.1.3. Fusion der Mäuse-Milzzellen mit den Myelomzellen

Alle Zellkulturmanipulationen wurden mit Medien ausgeführt, die bei 4 % CO_2 und 37°C vorinkubiert waren.

Mäuse, die im Radioimmuntest ein positives Ergebnis gezeigt hatten, wurden ein zweites Mal immunisiert wie beschrieben (siehe 3.3.1.1.).Die Mäuse wurden 4 Tage danach getötet, die Milz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen, in 5 ml Dulbecco's Phosphat-gepufferter Saline (DPS; Dulbecco und Vogt, 2954) zerkleinert,und die Milzzellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren der Gewebsstücke durch eine Pasteur-Pipette extrahiert. Grobe Gewebeteile wurden danach durch 1xg Sedimentation über 5 ml DPS abgetrennt, die Zellen wurden aus dem Überstand durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 UpM in einer Sorvall GLC-2 Zentrifuge gesammelt und sorgfältig in 5 ml frischem DPS suspendiert.

Die Myelomzellen der Linien NS-1 oder 65/3 wurden durch 5 min Zentrifugieren bei 1000 UpM in einer MSE-Minor-Zentrifuge gesammelt und sorgfältig in 5 ml frischem DPS suspendiert.

10^8 Milzzellen und $2x10^7$ Myelomzellen wurden zur Fusion mit Polyäthylenglycol (PEG) nach einer von Pontecorvo (1975) entwickelten und von Hämmerling (1977) modifizier-

ten Methode eingesetzt. Dazu wurden die Zellen gemischt und sofort für 5 min in einer MSE Minor-Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, und die gepackten Zellen wurden mit 0,5 ml PEG-Lösung vorsichtig in größeren Aggregaten aufgeschlämmt und genau 1 min bei 37°C inkubiert. (PEG Lösung: 28 ml DPS mit 15 % (v/v) Dimethylsulfoxyd, DMSO, wurde mit 20 g PEG 4000 gemischt, das zuvor durch 20 min Autoklavieren verflüssigt worden war; J. Hämmerling, persönliche Mitteilung.) Die Fusionsmischung wurde sofort danach durch tropfenweise Zugabe von 10 ml DPS in einer Gesamtzeit von 3 min ausverdünnt. Die Zugabe des DPS erfolgte anfangs langsam, mit fortschreitender Verdünnung schneller. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1000 UpM in einer MSE Minor-Zentrifuge abzentrifugiert, die Zellen wurden vorsichtig in einem geeigneten Volumen HAT-RPMI resuspendiert und auf 3 Gewebekulturplatten verteilt (Tissue Culture Clusters; Costar, USA, mit je 24x2 ml HAT-RPMI). Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert, und einmal wöchentlich wurde 1 ml HAT-RPMI gewechselt.

3.1.4. Klonierung

Nach ungefähr 2 Wochen Selektion mit HAT-RPMI waren sichtbare Kolonien herangewachsen, danach wurde zweimal wöchentlich 1 ml des Mediums gewechselt. Die Kulturüberstände wurden mit dem Radioimmuntest und der indirekten Immunfluoreszenz getestet (siehe 3.3.4.) und Zellinien, die ein positives Ergebnis in einem der beiden Tests ergaben, wurden weiter verarbeitet.

Es wurde 1 ml Kulturüberstand für Testzwecke entnommen, dann wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der Kulturschalen losgekratzt und in dem verbleibenden Medium suspendiert. Ein 0,9 ml Aliquot der Zellsuspension wurde nach Zugabe von 10% DMSO eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert. Die verbleibenden Zellen wurden auf ungefähr 10^4 bis 10^5 Zellen pro ml verdünnt und auf Weich-Agar kloniert.

Zuvor waren Agarplatten vorbereitet worden, indem ein Volumenteil 1%ige Agarlösung (DIFCO Noble Agar; bei 45°C inkubiert) mit einem Volumenteil 2-fach konzentriertem, auf 45°C erwärmtem HAT-DMEM gemischt und in 20 ml-Portionen in Petrischalen (8 cm Durchmesser, bakteriologisch, Greiner) ausgegossen worden war. Man ließ die Mischung in den Schalen 15 min bei Raumtemperatur gelieren, ein Überschuß der Mischung wurde in der Zwischenzeit im Wasserbad bei 45°C flüssig gehalten. 1 ml dieser Mischung wurde dann zu je 1 ml der Zellverdünnungen gegeben, durchmischt und sofort unter Vermeidung von Blasenbildung auf die Oberfläche einer Agarplatte ausgegossen und verteilt. Man ließ die Oberschicht für 15 min bei Raumtemperatur gelieren, danach wurden die Platten im Brutschrank inkubiert.

Ungefähr 2 Wochen später waren auf den Agarplatten Zellklone mit bloßem Auge zu erkennen. Einzelkolonien wurden unter einem Umkehrmikroskop ausgewählt, mit einer Pasteur-Pipette "gepickt" und in 1 ml DMEM ohne HAT überführt.

3.1.5. Kultivierung der Hybridzellen

Die klonierten Zellinien wurden in DMEM bei einer Zelldichte zwischen 10^5-10^6 Zellen pro ml in Petrischalen kultiviert. Von Zeit zu Zeit wurden die Klone auf Antikörperproduktion überprüft und, wenn nötig, weiter kloniert.

3.1.6. Drosophila-K_c-Zellen

Die Drosophila melanogaster Zellinie K_c (Echalier und Ohanessian, 1970), die mir freundlicherweise Dr. H.Biessmann zur Verfügung stellte, wurde im 1000 ml-Maßstab in Erlenmeyer-Kolben in D20-Medium (Echalier und Ohanessian, 1970) bei 25°C inkubiert. Die Zellen wurden dabei mit einem Magnetrührer in Suspension gehalten. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 10^6-10^7 Zellen/ml gehalten.

3.2. Antigendarstellung

3.2.1. Gesamt-Kernprotein

Exponentiell wachsende K_c-Zellen ($5x10^6$ Zellen/ml) wurden 10 min bei 5000 UpM in einer Sorvall RC-5 Zentrifuge im GSA-Rotor abzentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellkerne aus den K_c-Zellen wurden nach der Methode von Biessmann et al. (1976) isoliert. Ungefähr $5x10^8$ Kerne pro ml wurden in 1 mM Natriumphosphatpuffer (NaP), pH 7,0, aufgenommen und mit einem Branson-Ultraschallgerät mit Mikrospitze in 30 sec Stößen, unterbrochen durch ein einminütiges Abkühlen auf Eis, bei 60 W beschallt, bis alle Kerne aufgebrochen waren (Inspektion der Suspension am Phasenkontrast-Mikroskop). Die trübe Lösung wurde als Gesamt-Kernprotein bezeichnet.

3.2.2. Fraktionierung von Kernproteinen auf Biogel HT

Gesamt-Kernprotein wurde 10 min bei 10 000 UpM in einer Sorvall RC-5 Zentrifuge im HB-4 Rotor abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde einmal mit einem kleinen Volumen 1 mM NaP, pH 7,0, gewaschen, die vereinigten Überstände, die ungefähr 80 % des Gesamt-Kernproteins enthielten, wurden als "lösliches" Kernprotein bezeichnet. Eine grobe Fraktionierung dieses "löslichen" Kernproteins über eine Biogel HT-Säule wurde,wie von Bloom und Anderson (1977) beschrieben, durchgeführt. Biogel HT (BioRad Laboratories) wurde durch mehrfaches Suspendieren und Dekantieren in 1 mM NaP, pH 7,0, äquilibriert und von feinen Partikeln befreit. Das Material wurde in Säulen mit Kapazitäten von 2-60 ml gepackt und mit "löslichem" Kernprotein (10 OD_{260} ungefähr 0,5 mg DNA-Äquivalent pro ml gepacktes Gel) beschickt. Die Säulen wurden bei 8°C und einer Durchflußgeschwindigkeit von einem Säulenvolumen pro Stunde betrieben. Die Säule wurde mit einem Säulenvolumen 1 mM NaP, pH 7,0, gewaschen und danach mit je 2 Säulenvolumen der folgenden Lösungen stufenweise eluiert:

i. 80 mM NaP, pH 7,0, 250 mM NaCl, 5 mM $NaHSO_3$
ii. 80 mM NaP, pH 7,0, 2 M NaCl, 5 mM $NaHSO_3$
iii. 80 mM NaP, pH 7,0, 2 M NaCl, 5 M Harnstoff, 5 mM $NaHSO_3$
iv. 80 mM NaP, pH 7,0, 5 M Harnstoff, 4 M Guanidinium HCl, 5mM $NaHSO_3$ und
v. 500 mM NaP, pH 7,0, 2 M NaCl, 5M Harnstoff, 5 mM $NaHSO_3$.

Das nicht an die Säule gebundene Material wurde als Hydroxylapatit Fraktion 1 bezeichnet, die darauf folgenden Fraktionen als Hydroxylapatit Fraktion 2-6. Die Fraktionen wurden mit mehreren Puffer-Wechseln gegen 1 mM NaP, pH 7,0 dialysiert, lyophilisiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.3. Immunologische Techniken

3.3.1. Immunisierung

3.3.1.1. Mäuse

1 mg Gesamt-Kernprotein oder 0,1 mg der Hydroxylapatit-Fraktionen 2-6, suspendiert in 0,85 % Saline wurde in weibliche Mäuse[1] als Doppelemulsion injiziert. Dazu wurde ein Volumenteil Antigensuspension mit einem Volumenteil komplettem Freund's Adjuvans (GIBCO, Schottland) emulgiert. Diese Mischung wurde weiter mit 2 Volumenteilen 2 % Tween 80 (Serva) in 0,85 % Saline emulgiert. 14 Tage später wurde eine zweite Immunisierung in derselben Weise vorgenommen, mit der Ausnahme, daß inkomplettes Freund's Adjuvans (GIBCO, Schottland) anstelle von komplettem Freund's Adjuvans verwendet wurde. Weitere 14 Tage später wurden die Mäuse aus der Schwanzvene geblutet und die Antiseren mit dem Radioimmuntest und der indirekten Immunfluoreszenz getestet.

3.3.1.2. Kaninchen

Es wurden 100µg Maus-Fabγ-Fragmente (siehe 3.3.2.1.1.) in 0,85 % Saline gelöst und mit einem Volumenteil komplet-

---

[1] In den beschriebenen Experimenten wurden weiße Mäuse verwendet, die in diesem Labor über 10 Jahre ingezüchtet und auf große Wurfgrößen (> 10/Wurf) selektiert worden waren. Die genaue Abstammung der Mäuse ist unsicher. Vorläufiges Austesten des Histokompatibilitätstyps (freundlicherweise von Dr. K. Götze, MPI für Biologie, Abteilung für Immungenetik, Tübingen, durchgeführt) ergab jedoch, daß zumindest einige der Mäuse Merkmale sowohl für den q- als auch für den STU-Haplotyp tragen (Klein, 1975; Schäfer, 1979). Dies bedeutet, daß einige Hybridomlinien 3 verschiedene Allele bestimmter H2-Genorte besitzen und es folglich schwierig sein dürfte, sie als Ascites unter Umgehung des Immunsystems des Wirts zum Wachstum zu bringen.

tem Freund's Adjuvans, danach mit zwei Volumenteilen 2 % Tween 80 in 0,85 % Saline, emulgiert. Die Emulsion wurde subcutan an 5 Stellen einschließlich der Nackenregion in erwachsene Kaninchen injiziert. 14 Tage später wurde eine zweite Immunisierung in derselben Weise vorgenommen mit der Ausnahme, daß inkomplettes an Stelle von komplettem Freund's Adjuvans verwendet wurde. 8 Tage später wurden 50µg Maus-Fabγ-Fragmente als Doppelemulsion in inkomplettem Freund's Adjuvans und 2 % Tween 80 direkt in die Ohrvene injiziert. Weitere 8 Tage später wurden die Kaninchen aus einer größeren Ohrarterie geblutet und die Antiseren mit dem Ouchterlony-Doppeldiffusionstest (Ouchterlony und Nilsson, 1978) gegen Maus-Fabγ-Fragmente getestet. Die Kaninchen wurden danach noch mehrmals im Abstand von 5 Tagen geblutet, bis ein Absinken des Antikörpertiters beobachtet wurde.

3.3.2. Darstellung von Antikörperreagenzien

3.3.2.1. Darstellung von Kaninchen-Anti-Maus-Fabγ-Antikörpern (KAM Fab)

3.3.2.1.1. Darstellung von Maus-IgG-Fab-Fragmenten

Mäuseserum (Paesel) wurde gegen 10 mM Tris HCl, pH 7,5, dialysiert. Das Serum wurde danach unter Schütteln für 12 Std bei 4°C mit Protein A-Sepharose inkubiert (Pharmacia, 1 mg gebundenes Protein A pro ml Serum), die mit demselben Puffer äquilibriert worden war. Die Protein A-Sepharose wurde in eine Säule gepackt, mit dem 5-fachen Säulenvolumen Tris-HCl, pH 7,5, gewaschen und mit 1 M Essigsäure stufenweise eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden sofort mit 2 M Tris-Base neutralisiert, gegen 10 mM Tris

HCl, pH 7,5, 10 mM Cystein, 2 mM EDTA dialysiert, durch Ultrafiltration mit einer Amicon UM 10-Membran auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml gebracht und 16 Std bei 37°C mit 10µg Papain (Serva, ungefähr 10 U/mg) pro mg Protein verdaut. Der Abbau wurde abgebrochen, indem die Probe auf Eis überführt und auf 10 mM $ZnCl_2$ (Sluyterman, 1969) gebracht wurde. Ein auftretender Niederschlag wurde abzentrifugiert und Fab-Fragmente, Fc-Fragmente und nicht abgebautes IgG wurden von kleineren Abbaubruchstücken und dem Enzym durch Gelfiltration auf Sephadex G50 (Pharmacia, 5 ml gepacktes Gel pro mg Protein; äquilibriert in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $ZnCl_2$; Durchflußrate 0,1 Säulenvolumen pro Stunde) abgetrennt. Die Fraktionen des ersten Proteinmaximums wurden vereinigt, gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 dialysiert und für 12 Std bei 4°C mit Protein A-Sepharose (4 mg Protein pro mg gebundenem Protein A) geschüttelt. Die Protein A-Sepharose wurde abzentrifugiert, einmal mit einem kleinen Volumen 10 mM Tris HCl, pH 7,5, gewaschen und die vereinigten Überstände, die elektrophoretisch reine Maus-Fabγ-Fragmente enthielten, wurden nach Lyophilisieren bei -80°C gelagert.

3.3.2.1.2. Reinigung von Kaninchen-Anti-Maus-Fabγ-Antikörpern (KAM-Fab) aus Kaninchenseren

Aus den Seren von mit Maus-Fabγ immunisierten Kaninchen wurde nach Fahey (1967) die IgG-Fraktion isoliert. KAM-Fab wurde aus dieser rohen IgG-Fraktion mit an Sepharose 4B gekoppelten Maus-Fabγ-Fragmenten (siehe 3.3.2.2.) gereinigt. Dazu wurde die IgG-Fraktion für 12 Std bei 4°C unter Schütteln mit Maus-Fabγ-Sepharose inkubiert (20 mg IgG-Fraktion

pro mg gebundenen Maus-Fabγ- Fragmenten). Die Sepharose wurde in eine Säule gepackt, mit 5 Säulenvolumen 10 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 1 M NaCl gewaschen und stufenweise mit 1 M Essigsäure eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden sofort mit 2 M Tris-Base neutralisiert, die geeigneten Fraktionen wurden vereinigt und nach Dialyse gegen 10 mM Natriumphosphat, pH 7,5, bei -80°C gelagert. Der Antikörpertiter wurde durch einen Doppelimmundiffusionstest gegen Maus-Fabγ-Fragmente nach Ouchterlony und Nilsson (1978) ermittelt.

3.3.2.2. Kopplung von Proteinen an Sepharose 4B

Maus-Fabγ-Fragmente und KAM-Fab wurden nach der Methode von March et al. (1974) an Cyanbromid-aktivierte Sepharose gekoppelt. Der Kopplungsgrad betrug jeweils ungefähr 1 mg Protein pro ml gepackte Sepharose 4B.

3.3.2.3. Jodierung von Proteinen

Proteine wurden nach der Methode von Greenwood et al. (1969) mit ^{125}J markiert. Die spezifische Aktivität betrug im Fall des ^{125}J-KAM Fab etwa 22 mCi pro mg.

3.3.3. Immunologische Nachweismethoden

3.3.3.1. Radioimmuntest

Pro Vertiefung einer PVC-Mikrotiterplatte (V-plate disposable, Cooke; bezogen von Flow) ließ man 10 bis 100µg Antigen (Gesamt-Kernprotein oder Hydroxylapatit-Fraktionen 2-6) in einem Gesamtvolumen von 100µl Phosphatgepufferter Saline (PS:0,14 M Natriumchlorid, 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,5) für 15 min bei Raumtemperatur ad-

sorbieren. Der Überstand wurde danach abgesaugt und die Platten mit je 300µl PS pro Vertiefung gewaschen. Alle weiteren Manipulationen erfolgten auf Eis. Die restliche Proteinbindungskapazität wurde durch 2-stündige Inkubation der Vertiefungen mit je 300µl 0,1 % Rinderserumalbumin (SIGMA, Cohn Fraktion V) in PS abgesättigt. Die Vertiefungen wurden dann zweimal mit PS gewaschen und für 12 Std mit je 200 µl Zellkulturüberständen oder geeignet in PS verdünnten Mäuseseren inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PS wurden pro Vertiefung 10^5 cpm ^{125}J-KAM Fab in 100µl 0,1 % Triton X 100 in PS zugegeben. Nach erneuter 12-stündiger Inkubation wurden die Vertiefungen zweimal mit je 300µl 0,1 % Triton X 100 in PS gewaschen, sorgfältig trockengesaugt und von der Platte ausgeschnitten. Die gebundene Radioaktivität wurde in einem Gammazähler ausgezählt (GC 4000, Deutsche Intertechnique). Die Zählausbeute betrug ungefähr 85 %. Zur Bestimmung des Hintergrunds wurde entweder anstelle des Antigens mit PS inkubiert oder anstelle des Antiserums mit Nullserum bzw. anstelle des antikörperhaltigen Zellkulturüberstands mit Zellkulturmedium inkubiert. Radioimmun-positive Seren bzw. Überstände zeigten, verglichen mit der Kontrolle, eine 5- bis 50-fach erhöhte Bindung von ^{125}J KAM Fab.

3.3.3.2. Ouchterlony Doppelimmundiffusion

Maus- und Kaninchenseren wurden zu diesem Test in geeigneter Verdünnung mit PS eingesetzt. Zellkulturüberstände wurden zu diesem Test etwa 10-fach durch Lyophilisieren oder in Minicon-Konzentrationseinheiten (A75,B15; Amicon)

konzentriert. Der Test erfolgte nach einer Doppelimmundiffusionsmethode von Ouchterlony und Nilsson (1978) auf Objektträgern. Klassen- und subklassenspezifische Anti-Maus-Immunglobulinantikörper wurden von Byk-Mallinckrodt (Nordic Immunology, Großbritannien) bezogen.

3.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz

3.3.4.1. Fixierungsmethoden und Herstellung von Speicheldrüsenquetschpräparaten

Drosophila melanogaster Oregon Wildtyp, Drosophila hydei Wildtyp und Drosophila virilis Wildtyp wurden bei Raumtemperatur gezogen.Larven des 3. Stadiums, die an der Wand des Zuchtgefäßes hochzukriechen begannen, wurden zur Anfertigung der Speicheldrüsenquetschpräparate verwendet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Speicheldrüsen wurden in PS mit 1 % Triton X 100 herauspräpariert. Im Fall der Formaldehydfixierung (Jamrich et al. 1977) wurden die Drüsen innerhalb von 30 sec in eine Fixierungslösung mit 3,7 % Formaldehyd im Präparationsmedium überführt. Nach genau 30 sec Fixierung wurden die Drüsen auf ein Deckgäschen zu einem Tropfen 3,7 % Formaldehyd in 45 % Essigsäure überführt. Nach etwa einer Minute wurde das Deckgläschen mit einem sauberen Objektträger aufgenommen, und die Drüsen wurden geschert, indem das Deckgläschen durch Stoßen des Objektträgers gegen den Handballen über die Objektträgeroberfläche "geschlittert" wurde. Die Güte der Präparate wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop überprüft und ein Überschuß der Quetschflüssigkeit durch "Ablöschen" mit einem Papierhandtuch entfernt. Der Objekt-

träger wurde für 15 sec in flüssigen Stickstoff getaucht und das Deckgläschen unmittelbar danach mit einer Rasierklinge abgesprengt. Die Präparate wurden für 10 min in 95 % Äthanol in eine Färbeküvette gestellt und danach zweimal für 10 min in einer Färbeküvette mit PS gewaschen. Diese Präparate wurden unmittelbar für die Anfärbung mit Antikörpern verwendet.

Im Fall der Essigsäurefixierung (Will, 1979) wurde kein Formaldehyd verwendet. Die Drüsen wurden nach der Präparation direkt zu einem Tropfen 45 % Essigsäure auf einem Deckgläschen überführt und nach einer Minute Inkubation gequetscht wie beschrieben.

Silver u. Elgin (1978b) und Will (1979) beschrieben, daß mit der Essigsäurefixierungsmethode oft andere Anfärbungen in der indirekten Immunfluoreszenz erhalten werden als mit der Formaldehydfixierung. Neben anderen Ursachen können unterschiedliche Extraktion, fixierungsbedingte unterschiedliche Zugänglichkeit des Antigens sowie Abbau oder Denaturierung der antigenen Determinante unter den Fixierungsbedingungen zu diesen Unterschieden beitragen.

3.3.4.2. Anfärbung und Photographie

Die Objektträger wurden nach der zweiten PS-Inkubation abgetropft und für 30 min mit 10µl Antikörper enthaltender Lösung (Zellkulturüberstand oder geeignet in PS verdünnte Mäuseseren) in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden zweimal in PS gewaschen und auf dieselbe Weise, aber im Dunkeln mit 10µl fluoreszierendem sekundärem

Antikörper inkubiert (FITC-konjugierte IgG-Fraktion von Kaninchen-Anti-Maus-IgG, Miles, 1:40 verdünnt in PS). Nach zweimaligem Waschen in PS wurde ein sauberes Deckgläschen mit einem Tropfen PS montiert. Als Kontrollen wurden entsprechend verdünnte Nullseren, Zellkulturmedien oder NS-1 Zellkulturüberstände eingesetzt. Als positiv wurden Seren und Zellkultur-Überstände gewertet, die eine reproduzierbare, spezifische und deutlich über dem cytoplasmatischen Hintergrund liegende Fluoreszenzanfärbung zeigten.

Die Präparate wurden in einem ZEISS Universal-Mikroskop, ausgerüstet mit Epifluoreszenz (435-490 nm; 520 nm),untersucht und photographiert. Die Phasenkontrastbilder wurden entweder direkt oder nach Anfärben der Präparate mit Orcein in Milch-Essigsäure (Lefevre, 1976) aufgenommen. Als Film für die Fluoreszenzphotographie wurde Tri-X-Pan (Kodak) verwendet. Die Phasenkontrastbilder wurden mit demselben Film oder nach Anfärbung mit Orcein mit einem Pan F (Ilford) aufgenommen.

3.3.5. Immunpräzipitation mit Kaninchen-Anti-Maus-Fabγ gekoppelt an Sepharose 4B (KAM Fab Sepharose)

Gesamt-Kernproteine wurden für 12 Std bei 4°C mit ausreichenden Mengen Zellkultur-Überstand inkubiert. Als Kontrolle wurde Zellkultur-Medium (anstelle des Antikörpers) oder PS (anstelle des Antigens) verwendet. Ein eventuell auftretendes Präzipitat wurde abzentrifugiert und der Überstand zu einem Überschuß KAM Fab,gekoppelt an Sepharose 4B, gegeben. Nach 12 Std Inkubation bei 4°C unter Schütteln wurde die Sepharose abzentrifugiert und dreimal mit dem

5-fachen Volumen "Detergens-Mix" gewaschen (0,5 % SDS, 1 % Triton X 100, 1 % Natriumdesoxycholat in 100 mM Tris HCl, pH 7,5, 10 mM Kaliumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid). Die Sepharose wurde einmal mit dem 5-fachen Volumen 100 mM Tris HCl, pH 6,8, gewaschen und mit einem halben Volumen Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, 1970) für 1 min bei 100°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Sepharose wurde danach abzentrifugiert und der Überstand auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

3.3.6. Nachweis der Antigene nach Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose (Protein Blotting)

1 mg Gesamtkernprotein wurde auf 1 mm dicken 12,5 % SDS-Gelen oder 8-18 % SDS Gradientengelen nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Gele wurden kurz mit Wasser abgespült, und ein Vergleichsstreifen wurde direkt mit Coomassie Brilliant Blue R 250 angefärbt (in einigen Experimenten wurde nach Bowen et al. (1980) ein Renaturierungsschritt in Gelen durchgeführt, indem diese nach der Elektrophorese für 1 Std in 100 ml 10 mM Tris HCl, pH 7,0, 50 mM Natriumchlorid, 4 M Harnstoff und 0,4 mM Dithiothreitol inkubiert wurden). Das Trenngel wurde darauf nach der Methode von Southern (1975) auf Nitrocellulosefilter (SM 113, Sartorius) "geblottet". Dabei nahm man als "Blotting"-Puffer dreifach konzentrierten Elektrophoresepuffer (Laemmli, 1970) ohne SDS. Das über dem Gel liegende Nitrocellulosefilter sowie 2 Lagen Whatman 3 MM Filterpapier waren mit Wasser befeuchtet worden. Der

Transfer wurde 24 Std bei Zimmertemperatur durchgeführt. Ein Vergleichsstreifen des Nitrocellulosefilters wurde mit Amidoschwarz nach der Methode von Schaffner et al. (1973) angefärbt.

Die verbleibende Proteinbindungskapazität des Nitrocellulosefilters wurde durch 2 Stunden Inkubation in 1 % Rinderserumalbumin in PS abgesättigt und das Filter vertikal in etwa 1 cm breite Streifen geschnitten. Jeder der Streifen wurde unter Schütteln für 3 Std mit 5 ml Zellkultur-Überstand oder geeignet verdünntem Antiserum bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem 30-minütigem Waschen in PS wurden die Streifen bei Raumtemperatur für 2 Std mit je $2x10^5$ cpm ^{125}J-KAM Fab in 5 ml PS mit 0,1 % Rinderserumalbumin inkubiert. Danach wurden die Streifen kurz mit PS gespült und getrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde durch 6 Std Inkubation bei -80°C mit einem Kodak-Röntgenfilm und einer DuPont Cronex Quanta II Verstärkerfolie autoradiographisch nachgewiesen. Die Molekulargewichte der Antigene wurden durch Vergleich mit mittransferierten ^{125}J-markierten Eichproteinen oder dem angefärbten Gelstreifen ermittelt.

3.4. Elektrophorese und analytische Nachweismethoden

Proteine wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen mit dem diskontinuierlichen Puffersystem von Laemmli (1970) analysiert. Die Analyse wurde auf 12,5%igen oder 8-18%igen Flachgelen durchgeführt.

Protein wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Der DNS-Gehalt wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt.

3.5. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden als p.A. Substanzen von der Firma Merck bezogen. Elektrophorese-Reagenzien, Aminopterin, Hypoxanthin und Thymidin stammten von Serva. SDS und Biogel HT wurden von BioRad Laboratories geliefert, PEG 4000 wurde von der Firma Roth bezogen. Alle Experimente wurden mit doppelt destilliertem Wasser durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Darstellung der Antigene

Gesamtkernprotein der D.melanogaster-Zellinie K_c wurde wie in Material und Methoden beschrieben abzentrifugiert, und "lösliches" Kernprotein im Zentrifugationsüberstand wurde auf einer Hydroxylapatit-Säule fraktioniert.

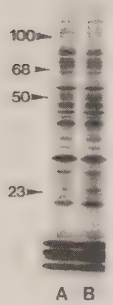


Abb.1 Vergleich des Proteinmusters "löslicher" Kernproteine mit Gesamt-Kernproteinen: 50 µg "lösliches" Kernprotein und Gesamtkernprotein Der D.melanogaster-Zellinie K_c wurden auf einem 8-18% SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) aufgetrennt. (A) "Lösliches" Kernprotein. (B) Gesamtkernprotein. Als Eichproteine wurden Proteine folgender Molekulargewichte verwendet: Phosphorylase a, Muskel (100 000); Rinderserumalbumin (68 000); γ-Globulin, schwere Kette (50 000); γ-Globulin, leichte Kette (23 000). Die Molekulargewichte sind in Kilodalton durch Pfeilmarkierung neben den Gelstreifen angegeben.

Es waren etwa 80 % des Gesamtkernproteins in der "löslichen" Fraktion enthalten. Bei einem Vergleich der Polypeptidmuster beider Fraktionen auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Abb.1) waren nur geringfügige Unterschiede festzustellen.

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis der Fraktionierung "löslicher" Kernproteine auf der Hydroxylapatitsäule. Die einzelnen Fraktionen zeigen ein klar voneinander unterscheidbares Polypeptidmuster mit deutlicher Anreicherung spezifischer Komponenten in den einzelnen Fraktionen. Darüber

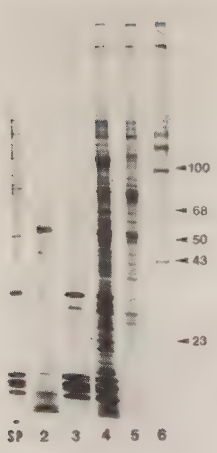


Abb.2 Fraktionierung "löslicher" Kernproteine auf Hydroxylapatit
4 mg "lösliches" Kernprotein wurde auf einer 2 ml Hydroxylapatitsäule aufgetrennt. Die eluierten Fraktionen wurden nach Dialyse gegen 1 mM NaP pH 7,0 und Lyophilisieren auf einem 8-18% Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) analysiert. Es wurden folgende Proteinmengen auf das Gel aufgetragen: 15µg "lösliche" Kernproteine (SP), 10µg Hydroxylapatitfraktion 2, 15µg Hydroxylapatitfraktion 3, 20µg Hydroxylapatitfraktion 4, 15µg Hydroxylapatitfraktion 5 und 10µg Hydroxylapatitfraktion 6. Die unter den Gelstreifen angegebenen Zahlen stehen für die einzelnen Hydroxylapatitfraktionen. Die angegebenen Eichproteine sind dieselben wie in Abb.1; zusätzlich wurde Ovalbumin (43 000) aufgetragen.

hinaus ist in direkt aufeinander folgenden Fraktionen eine teilweise Überlappung des Proteinmusters festzustellen.

Fraktion 1 enthielt nur eine geringfügige Menge an Protein und wurde in Abb.1 nicht mit dargestellt. Die Fraktion 2 enthält einige prominentere Banden im Molekulargewichtsbereich 20 000 - 50 000 Dalton. In Fraktion 3 wurden hauptsächlich die Histonproteine eluiert. Fraktion 4 und 5 zeigen ein sehr komplexes Polypeptidmuster. In diesen Fraktionen wurde die Hauptmenge der RNS und DNS (Messung von OD_{260}; siehe auch Bloom und Anderson, 1977) zusammen mit dem Rest der Histonproteine und einer großen Anzahl verschiedener Kernproteine eluiert. Fraktion 6 schließlich enthält einige stärkere Banden höheren Molekulargewichts (80 000 - 120 000 Dalton) und ebenfalls DNS (Messung von OD_{260}; siehe Bloom und Anderson, 1977).

Tabelle 1 Darstellung der Antigene

Protein-Fraktion	Elutionsbedingungen	Gesamt-Kernprotein %
Gesamt-Kernprotein	-	100
"Lösliches" Kernprotein	-	78
Hydroxylapat. Fraktion 1	1 mM NaP, pH 7,0	0,3
Hydroxylapat. Fraktion 2	80 mM NaP, pH 7,0, 250 mM NaCl, 5 mM $NaHSO_3$	3,5
Hydroxylapat. Fraktion 3	80 mM NaP, pH 7,0, 2 M NaCl, 5 mM $NaHSO_3$	30
Hydroxylapat. Fraktion 4	80 mM NaP, pH 7,0, 2 M NaCl, 5 M Harnstoff, 5 mM $NaHSO_3$	4,2
Hydroxylapat. Fraktion 5	80 mM NaP, pH 7,0, 5 M Harnstoff, 4 M Guanidinium HCl, 5 mM $NaHSO_3$	20,7
Hydroxylapat. Fraktion 6	0,5 M NaP, pH 7,0, 2 M NaCl, 5 M Harnstoff, 5 mM $NaHSO_3$	1,2
Hydroxylapat. Gesamt	-	59,9

Die angegebenen Werte stammen von der in Abb. 1 dargestellten Auftrennung.

Tabelle 1 faßt die Ergebnisse der Antigendarstellung zusammen und liefert Angaben über die in jeder Fraktion enthaltene Proteinmenge. Etwa 75 % des aufgetragenen "löslichen" Kernproteins konnten von der Säule eluiert werden. Der Rest wurde möglicherweise infolge von Präzipitation auf der Säule verloren.

4.2. Etablierung der Zellinien

4.2.1. Immunantwort

Es wurden je 4 Mäuse mit Gesamtkernproteinen bzw. den Hydroxylapatit-Fraktionen 2-6 immunisiert wie in Material und Methoden beschrieben. Die Antiseren wurden in einer Reihe von Verdünnungen radioimmunologisch gegen die entsprechende Antigenfraktion ausgetestet. Die Testergebnisse bei 1000-facher Serumverdünnung sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 Immunantwort der Mäuseseren im Radioimmuntest

Maus Nr.	Antigen	$cpm_{geb.}$ / $cpm_{Hintergr.}$	Fusions-bezeichnung
1	Gesamt-Kernprot.	12 000 / 450	I,J
2	Hydroxylap. Fraktion 2	10 200 / 930	O,P
3	Hydroxylap. Fraktion 2	15 800 / 890	Q,R
4	Hydroxylap. Fraktion 3	1700/550 (5200/620)	Al, Am
5	Hydroxylap. Fraktion 4	17 000 / 680	S,T
6	Hydroxylap. Fraktion 4	17 000 / 530	U,V
7	Hydroxylap. Fraktion 5	21 800 / 590	Y,Z
8	Hydroxylap. Fraktion 6	10 500 / 540	Ai, Aj

Die Mäuseseren wurden bei 1000-facher Serumverdünnung gegen entsprechend verdünntes Nullserum ausgetestet wie in Material und Methoden beschrieben. Die bei Maus Nr. 4 (Hydroxylapatit-Fraktion 3) in Klammern angegebenen Werte geben die Testergebnisse nach Immunisierung dieser Fraktion komplexiert mit t-RNS aus Hefe. Näheres siehe Text.

Mit einer Ausnahme zeigten alle getesteten Antiseren eine im Vergleich zu entsprechend verdünnten Null-Seren mindestens 5-fach höhere Bindung von ^{125}J-KAM-Fab. Die Mäuse, die mit Hydroxylapatit-Fraktion 3 immunisiert worden waren, zeigten im Radioimmuntest einen niedrigen Antikörpertiter. In dieser Fraktion waren die Histone als Haupt-Proteinkomponenten vertreten. Es ist bekannt, daß Histonproteine für sich allein nur schwach immunogen wirksam sind, daß jedoch ihre Immunogenizität durch Komplexierung mit RNA erhöht werden kann (Stollar, 1978). Diese Mäuse wurden daher nach dem üblichen Schema erneut mit der Hydroxylapatit-Fraktion 3 immunisiert, die diesmal im Verhältnis von 1:1 (w/w) mit t-RNS aus Hefe komplexiert worden war. Die in Tabelle 2 für die Hydroxylapatit-Fraktion 3 in Klammern angegebenen Zahlen liefern die Ergebnisse des Radioimmuntests der Seren nach dieser modifizierten Immunisierungsmethode. Der Antikörpertiter konnte um einen Faktor 3 erhöht werden.

Die Mausantiseren wurden weiterhin mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz auf Formaldehyd-fixierten Speicheldrüsenpräparaten von D.melanogaster getestet. Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse bei 40-facher Verdünnung der Antiseren in PS. Die Drüsen wurden dabei nur geringfügig gequetscht, um die Struktur der Zellen weitgehend zu erhalten. Abbildung 3a,b wurde mit dem Serum einer Maus erhalten, die mit Hydroxylapatit-Fraktion 2 immunisiert worden war. In diesem Fall scheinen ausschließlich selektive Stellen auf den polytänen Chromosomen angefärbt zu sein.

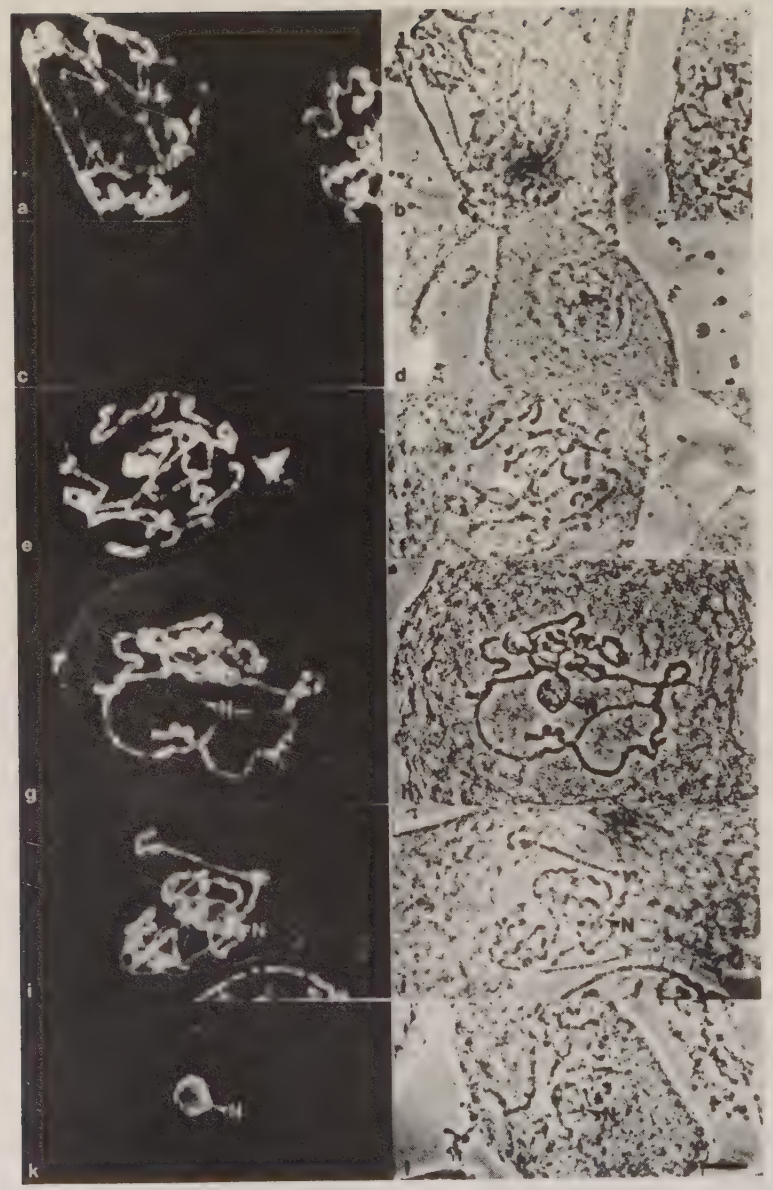


Abb. 3

Abbildung 3e,f zeigt die indirekte Immunfluoreszenz des Serums einer Maus, die mit Hydroxylapatit-Fraktion 3 (nach Komplexierung mit t-RNS) immunisiert worden war. Die Anzahl der selektiv angefärbten Stellen am Chromosom scheint in diesem Fall gegenüber Abb. 3a,b erhöht. Abbildung 3g,h wurde mit dem Serum einer Maus, immunisiert mit Hydroxylapatit-Fraktion 4, erhalten. Während das Färbemuster auf den Chromosomen wieder eher der Abb. 3a,b zu gleichen scheint, wird im Unterschied zu den bisher geschilderten Seren auch die Kernmembran und - schwach - der Nucleolus angefärbt. Das Serum einer Maus, die mit Hydroxylapatit-Fraktion 5 immunisiert worden war, färbt eine große Anzahl von Stellen am Chromosom; zusätzlich sind die Kernmembran und der Nucleolus deutlich angefärbt (Abb.3i,j). Die Abbildung 3k,l schließlich zeigt ausschließlich die Anfärbung des Nucleolus, wie sie mit dem Serum einer Maus, die mit Hydroxylapatit-Fraktion 6 immunisiert worden war, erhalten wurde. Eine Kontrolle mit entsprechend verdünntem Vor-Immunserum (Nullserum) der später mit Hydroxyapatit-Fraktion 2 immunisierten Maus ist in Abb.3c,d gezeigt. Die Nullseren aller anderen Mäuse ergaben ebenfalls keine spe-

Abb.3 Indirekte Immunfluoreszenz mit Mäuseseren
Die Anfärbung wurde bei 40-facher Serumverdünnung an Formaldehyd-fixierten Speicheldrüsen von D. melanogaster vorgenommen. Die Antiseren stammen von mit folgenden Antigenen immunisierten Mäusen: a) Hydroxylapatit-Fraktion 2, c) Nullserum derselben Maus, e) Hydroxylapatit-Fraktion 3, g) Hydroxylapatit-Fraktion 4, i) Hydroxylapatit-Fraktion 5, k) Hydroxylapatit-Fraktion 6. b), d), f), h), j) und l) sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen. KM: Kernmembran, N: Nucleolus. Der Balken in dieser und den folgenden Abbildungen entspricht 25µm.

zifische Anfärbung irgendwelcher Strukturen der Speicheldrüsenzelle.

4.2.2. Ergebnisse der Fusion auf der Ebene der Zellinien

Je 2 Mäuse, immunisiert gegen Hydroxylapatit-Fraktion 2 oder Hydroxylapatit-Fraktion 4, und je eine Maus, immunisiert mit Gesamtkernproteinen, Hydroxylapatit-Fraktion 3 (nach t-RNS-Behandlung), Hydroxylapatit-Fraktion 5 oder Hydroxylapatit-Fraktion 6, wurden zur Zellhybridisierung eingesetzt. Für jede Maus wurden 2 unabhängige Zellfusionsexperimente durchgeführt. Im Durchschnitt wuchsen in 75 % der ausgesäten Kulturen Hybridzellen, deren Überstände radioimmunologisch getestet wurden. Weiterhin wurden bisher 387 Zellinien-Überstände mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz an Formaldehyd-fixierten Speicheldrüsenpräparaten von D.melanogaster getestet. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 3 dargestellt. Von 761 Zellinien aus 16 Fusionsexperimenten waren 344 oder 45 % positiv im Radioimmuntest. Von den bisher mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz getesteten 387 Zellinien-Überständen

Tabelle 3 Die Zellinien wurden, wie in 3.1. beschrieben, etabliert. Im Radioimmuntest positive Zellkultur-Überstände zeigten gegenüber Zellkulturmedien als Kontrolle eine mindestens 5-fach erhöhte Bindung von ^{125}-J-KAM-Fab. Als positiv in der indirekten Immunfluoreszenz wurden Kulturüberstände bezeichnet, die eine deutliche und reproduzierbare Färbung spezifischer Kernstrukturen (Chromosomen, Kernmembran, Nucleolus) gegenüber dem cytoplasmatischen Hintergrund zeigten. Dabei wurden in allen Fällen Formaldehyd-fixierte Speicheldrüsen von D. melanogaster verwendet.

Tabelle 3 Etablierung permanenter Zellinien aus Lymphozyten; Zusammenfassung

Fusions-Experiment	Antigen-Fraktion	Myelom-Zellinie	Gesamtzahl erhaltener Hybrid-Zell-linien	Zahl d. im Radio-immuntest positiven Zellinien	Zahl d. in der indirekten Im-munfluoreszenz positiven Zell-linien[1]
I	Ges.Kernprotein	NS1	63	45	5 (39)
J	Ges.Kernprotein	65/3	62	51	1 (16)
O	Hydroxylap.Fr.2	65/3	35	4	n.n.
P	Hydroxylap.Fr.2	NS1	63	19	2 (2)
Q	Hydroxylap.Fr.2	NS1	72	56	3 (3)
R	Hydroxylap.Fr.2	65/3	69	3	n.n.
Al	Hydroxylap.Fr.3	NS1	63	3	3 (63)
Am	Hydroxylap.Fr.3	NS1	60	6	- (57)
S	Hydroxylap.Fr.4	NS1	10	3	2 (8)
T	Hydroxylap.Fr.4	NS1	68	36	7 (46)
U	Hydroxylap.Fr.4	NS1	34	20	6 (27)
V	Hydroxylap.Fr.4	NS1	26	19	4 (23)
Y	Hydroxylap.Fr.5	NS1	58	30	17 (46)
Z	Hydroxylap.Fr.5	NS1	57	41	8 (41)
Ai	Hydroxylap.Fr.6	NS1	-	-	--
Aj	Hydroxylap.Fr.6	NS1	21	8	6 (16)
G E S A M T			761	344	64(387)

[1] Die Zahl in Klammern gibt die Zahl der in der indirekten Immunfluoreszenz getesteten Zellinien der betreffenden Fusion an. n.n. bedeutet "nicht bestimmt".

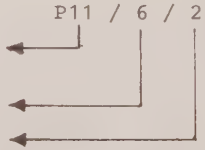
zeigten 64 (16,5 %) eine spezifische und reproduzierbare Anfärbung distinkter Strukturen in Speicheldrüsenzellen von D. melanogaster. 58 Zellinien-Überstände zeigten eine Anfärbung an polytänen Chromosomen; 5 Zellinien-Überstände färbten die Kernmembran und ein Zellinien-Überstand den Nucleolus.

Die Zellinien wurden darauf vor einer weiteren Untersuchung zumindest zweimal auf Weichagar kloniert, um sicherzugehen, daß man Zellinien klonalen Ursprungs erhalten hatte, die stabil waren im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Antikörper zu produzieren (siehe 5.). Im Weiteren werden Antikörper, die von zumindest zweifach klonierten Zellinien produziert wurden, als monoklonale Antikörper und die sie produzierenden Zellinien als Klone bezeichnet[2].

---

[2]Da es gegenwärtig keine systematische Nomenklatur für Hybrid-Zellinien und die von ihnen produzierten Antikörper gibt, wird in dieser Arbeit folgende, willkürliche Bezeichnung vorgenommen. Die anfängliche Hybridzellinie wird durch Buchstaben und die erste Zahl benannt. Die Buchstaben bezeichnen die Fusion, von der diese Linie stammte, die Zahl unterscheidet sie von den übrigen aus derselben Fusion erhaltenen Zellinien. Nachfolgende Klonierungen sind durch Schrägstriche und eine weitere der Unterscheidung dienenden Zahl gekennzeichnet.

Beispiel: P11 / 6 / 2



Bisher wurde keine Zellinie erhalten, die nach Klonierung auf Weichagar verschiedene Färbemuster zeigte. Deshalb wurde der Antikörper jedes Zellklons nur durch die Bezeichnung

4.3. Monoklonale Antikörper gegen Kernproteine von D. melanogaster

4.3.1. Monoklonale Antikörper gegen Kernmembranantigene

Von einer mit Hydroxylapatit-Fraktion 4 immunisierten Maus (vgl. Abb.3g,h) wurden u.a. 3 Zellinien erhalten, deren Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz die Kernmembran anfärbten. Weitere Zellinien, die ein ähnliches Färbeverhalten aufwiesen, wurden von einer zweiten, mit derselben Hydroxylapatit-Fraktion immunisierten Maus erhalten. Drei dieser Linien mit der Bezeichnung T4O, T5O und U25 wurden kloniert und die von ihnen produzierten Antikörper zur Charakterisierung des Antigens eingesetzt.

Abbildung 4a zeigt die Anfärbung einer Formaldehyd-fixierten Speicheldrüsenzelle von D.melanogaster mit dem Zellkultur-Überstand von Klon T4O/7/7 (Klone von den Linien T5O und U25 zeigten eine ähnliche Anfärbung). Die Fluoreszenz ist mit Ausnahme der heller erscheinenden Peripherie gleichmäßig über den Zellkern verteilt. Abbildung 4b zeigt die dazugehörige Phasenkontrastaufnahme. Dieselbe Fluoreszenz-Anfärbung wurde mit allen drei Antikörpern auch mit Essigsäure-fixierten Speicheldrüsen-Präparaten erhalten.

2(Forts.)
der Zellinie mit dem Anhängsel Ak (für Antikörper) bezeichnet (Entsprechendes gilt für Ag - Antigen). So wurde z.B. P11-Ak von mindestens 2O Klonen einschließlich P11/6/2 und P11/6/3 produziert. Sollten sich zwei Klone derselben Zellinie in Bezug auf die Eigenschaften der von ihnen produzierten Antikörper verschieden verhalten, würde die Klonbezeichnung anstelle der Zellinien-Bezeichnung zur Beschreibung des Antikörpers benutzt werden.

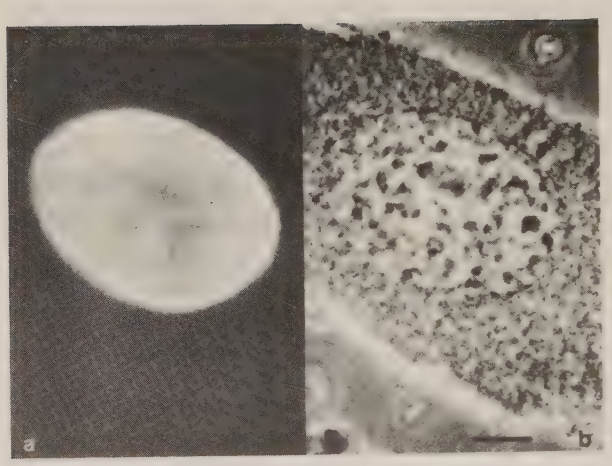


Abb.4 Monoklonale Antikörper gegen Kernmembranantigene (a) Immunfluoreszenz-Anfärbung einer Formaldehyd-fixierten Speicheldrüsenzelle von D.melanogaster mit T40-Ak vom Klon T40/7/7. (b) Phasenkontrast-aufnahme desselben Präparates.

die Intensität der Fluoreszenz war dabei allerdings etwas verringert. Formaldehyd-fixierte Speicheldrüsen-Präparate von D.virilis und D.hydei ergaben ebenfalls mit allen drei Antikörpern die geschilderte Anfärbung der Kernmembran.

Um das Molekulargewicht der Antigene der drei Antikörper zu ermitteln, wurde die in Material und Methoden beschriebene Proteintransfer-Methode verwendet.

Abbildung 5a zeigt noch einmal Gesamtkernproteine der D.melanogaster-Zellinie K_c nach deren Auftrennung auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel. Ein Referenzstreifen des Nitrocellulosefilters war nach dem Transfer der Proteine mit

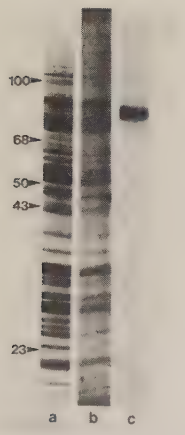


Abb.5 Identifizierung von Kernmembranantigenen mit der Proteintransfer-Methode
1 mg Gesamtkern-Protein wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf ein Nitrocellulosefilter transferiert. Nach Inkubation des Filters mit dem Kulturüberstand des Klons T40/7/7 und ^{125}J-KAM-Fab-Antikörper wurde das Antigen autoradiographisch nachgewiesen (siehe 3.3.6.). (a) Anfärbung eines Vergleichsstreifens des Gels mit Coomassie Brilliant Blue R 250. (b) Anfärbung eines Vergleichsstreifens der Nitrocellulose nach Proteintransfer mit Amidoschwarz. (c) Autoradiographie der Nitrocellulose nach Antikörperinkubation. Die angegebenen Eichproteine sind dieselben wie in Abb.1; zusätzlich wurde Ovalbumin (43 000) aufgetragen.

Amidoschwarz angefärbt worden. Abb.5b zeigt, daß ein getreues Abbild des Gelmusters erhalten werden konnte (siehe Diskussion). Durch Inkubation des Nitrocellulosefilters mit antikörperhaltigem Zellkulturüberstand und anschließend mit ^{125}J-markiertem KAM-Fab-Antikörper konnte die Antigenbande sichtbar gemacht werden. Dies ist für T40-Ak (von Zellklon T40/7/7) in Abb. 5 c gezeigt. Unter Verwendung von frisch präpariertem Gesamtkernprotein erhielt man mit allen drei monoklonalen Antikörpern eine Antigenbande von 80 000 Dalton Molekulargewicht. Mit Kernproteinen nach Lagerung bei -20^{o}C zeigten sich manchmal Zusatzbanden niedrigeren Molekulargewichts.

Diese Ergebnisse konnten durch Immunpräzipitation mit an Sepharose gekoppeltem KAM-Fab bestätigt werden. Alle 3 Antikörper banden ein Antigen von 80 000 Dalton Molekulargewicht (Daten nicht gezeigt).

4.3.2. Monoklonale Antikörper gegen Antigene des Nucleolus

Von einer Maus, die mit Hydroxylapatit-Fraktion 6 immunisiert worden war (vgl. Abb.3k,l), wurde eine Zellinie erhalten, die ausschließlich den Nucleolus anfärbte. Diese Zellinie wurde ebenfalls kloniert und in der indirekten Immunfluoreszenz an Formaldehyd-fixierten Speicheldrüsen-Präparaten von D.melanogaster getestet. Wie in Abb.6a,b gezeigt, wird von diesem Antikörper (Aj1-Ak) ausschließlich der Nucleolus angefärbt.

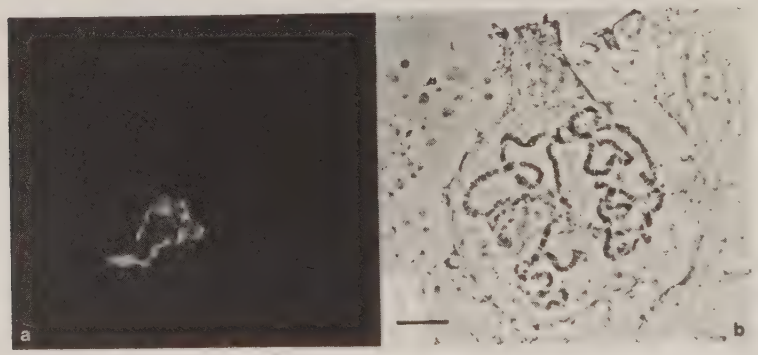


Abb.6 Monoklonale Antikörper gegen Antigene des Nucleolus (a) Immunfluoreszenz-Anfärbung einer Formaldehyd-fixierten Speicheldrüsenzelle von D.melanogaster mit Aj 1-Ak von Klon Aj1/1/2. (b) Dasselbe Präparat im Phasenkontrast.

Eine Analyse mit der Proteintransfer-Methode ergab als Antigen ein Polypeptid vom Molekulargewicht 47 000 Dalton.

4.3.3. Monoklonale Antikörper gegen chromosomale Proteine

Die Antikörper aller bisher untersuchten Zellinien, die an polytäne Chromosomen banden, zeigten ein sehr komplexes

Färbemuster in der indirekten Immunfluoreszenz. Bevor eine Detailanalyse der einzelnen Färbemuster zu einem festgelegten Zeitpunkt des 3. Larvalstadiums und/oder ein detaillierter Vergleich der Immunfluoreszenz zweier monoklonaler Antikörper an je einer der beiden Speicheldrüsen derselben Larve durchgeführt ist, können daher nur grobe, klar unterscheidbare Färbemuster vorgestellt werden. Im folgenden werden drei klar unterscheidbare Klassen der Anfärbung polytäner Chromosomen gezeigt. Diese Klassen konnten z.T. durch Hinzunahme weiterer Eigenschaften, wie der Kreuzreaktion mit Proteinen polytäner Chromosomen von D.virilis und D.hydei sowie der Empfindlichkeit der Färbung gegenüber verschiedenen Fixierungsbedingungen untergliedert werden. In einigen Fällen konnten Antikörper mit ähnlichem Färbeverhalten auf polytänen Chromosomen über die Identifizierung der zugehörigen Antigene nach ihrem Molekulargewicht in SDS-Gelen eindeutig verschiedenen Unterklassen zugeordnet werden.

4.3.3.1. Klasse 1: Monoklonale Antikörper gegen Proteine in "genaktiven" Bereichen (Puffs und prominente Interbanden)

Die meisten Zellinien-Überstände zeigten eine selektive Immunfluoreszenz-Anfärbung "aktiver" Regionen auf polytänen Chromosomen von D.melanogaster.

Abbildung 7 zeigt dies für P11-Ak von Klon P11/6/2 einer Maus, immunisiert mit Hydroxylapa tit-Fraktion 2 (vgl. auch Abb. 3a,b). Die Fluoreszenz-Anfärbung ist in diesem Fall mit den meisten Puffs und einigen anderen, im Phasenkontrastmikroskop hell erscheinenden Bereichen korreliert.

Das Chromozentrum ist ebenfalls angefärbt. Im Vergleich zu

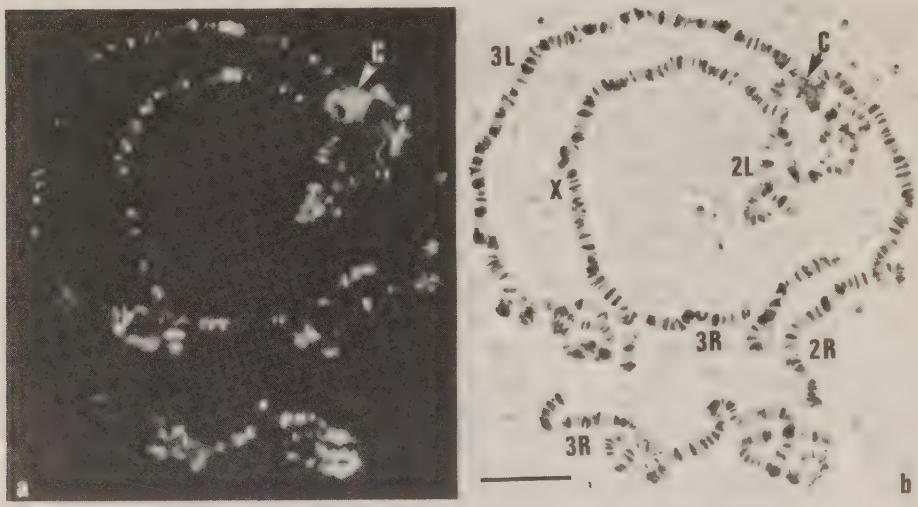


Abb.7 Anfärbung polytäner Chromosomen mit Antikörpern der Klasse 1
(a) Immunfluoreszenz-Anfärbung Formaldehyd-fixierter Chromosomen von D.melanogaster mit P11-Ak von Klon P11/6/2. (b) Dasselbe Präparat im Phasenkontrast nach Orceinfärbung. In dieser und den folgenden Darstellungen bezeichnet C das Chromozentrum; X, 2L, 2R, 3L, 3R bezeichnen die verschiedenen Chromosomenarme.

der nachfolgend beschriebenen Klasse 3 erscheinen weniger Interbanden stark angefärbt (selektive Anfärbung). Die Anfärbung zweier Drüsen derselben Larve mit demselben Zellkulturüberstand bzw. mit Zellkulturüberständen von verschiedenen isolierten Linien desselben Klons (Abbildung 8) war äußerst reproduzierbar. Essigsäure-fixierte Chromosomen zeigen dasselbe Färbemuster, allerdings mit einer geringfügigen Reduktion der Färbeintensität in den Interbanden (nicht gezeigt). Formaldehyd-fixierte Chromosomen von D. hydei und D.virilis zeigten mit P11-Ak keine Anfärbung.

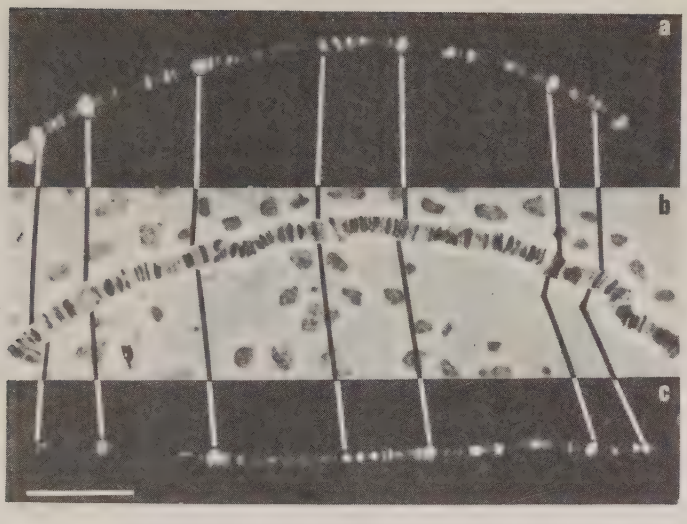


Abb.8 Reproduzierbarkeit der indirekten Immunfluoreszenz
Zwei Formaldehyd-fixierte Speicheldrüsen-Präparate einer D.melanogaster-Larve wurden getrennt mit P11-Ak von Klon P11/6/2 oder P11/6/3 angefärbt. (a) Immunfluoreszenz-Anfärbung des Chromosomenarms 2R mit P11/6/3-Kulturüberstand. (b) Dasselbe Präparat im Phasenkontrast nach Orcein-Anfärbung. (c) Immunfluoreszenz-Anfärbung eines Chromosomenarms 2R auf dem zweiten Präparat mit P11/6/2-Kultur-Überstand.

Abbildung 9b zeigt die Identifizierung des P11-Ag nach Proteintransfer als ein Polypeptid vom Molekulargewicht 38 000 Dalton . Dasselbe Ergebnis wurde durch Immunpräzipitation mit KAM-Fab-Sepharose 4B erzielt (nicht gezeigt).

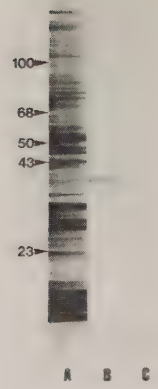


Abb.9 Identifiziertung chromosomaler Antigene mit der Proteintransfer-Methode
1 mg Gesamtkernprotein wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf ein Nitrocellulosefilter transferiert. Nach Inkubation des Filters mit den angegebenen Kulturüberständen und ^{125}J-KAM-Fab-Antikörper wurde das Antigen autoradiographisch nachgewiesen. (A) Anfärbung eines Vergleichsstreifens des Gels mit Coomassie Brilliant Blue R250. (B) Autoradiographie der Nitrocellulose nach Inkubation mit P11-Ak. (C) Autoradiographie der Nitrocellulose nach Inkubation mit P12-Ak. Die angegebenen Eichproteine sind dieselben wie in Abb.1; zusätzlich wurde Ovalbumin (43 000) aufgetragen.

Der Klon Q16/7/9 von einer zweiten, ebenfalls mit Hydroxylapatit-Fraktion 2 immunisierten Maus zeigte sehr ähnliche Eigenschaften. Die Anfärbung war in diesem Fall ebenfalls unempfindlich gegenüber Essigsäurefixierung, es lag keine Kreuzreaktion mit D.virilis und D.hydei vor, und das entsprechende Antigen war, bestimmt nach der Proteintransfer-Methode, ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 38 000 Dalton.

Eine ganze Reihe anderer Klone konnten nach ihrem Färbeverhalten der Klasse 1 zugeordnet werden. Dennoch zeigten sie einige Unterschiede:

- S5-Ak von einer Maus,immunisiert mit Hydroxylapatit-Fraktion 4 (vgl.Abb.3g,h) mit einem Polypeptidantigen von 70 000 Dalton Molekulargewicht, bestimmt mit der Proteintransfer-Methode, zeigte nur auf Formaldehyd-fixierten Chromosomen

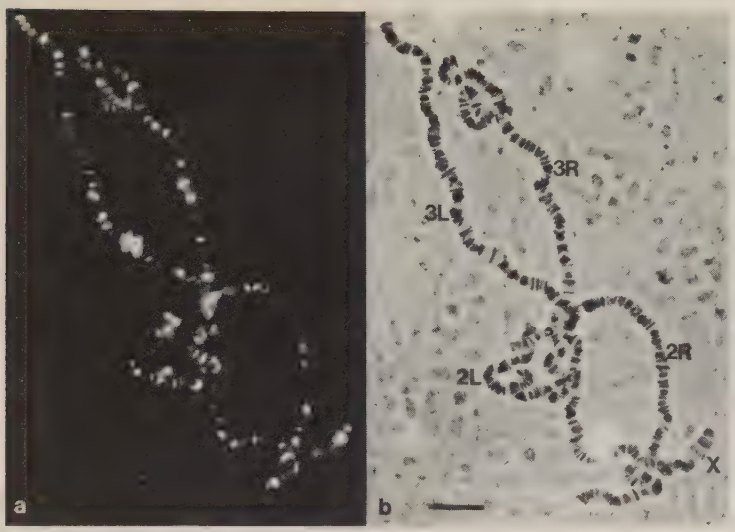


Abb.10 Anfärbung polytäner Chromosomen mit Antikörpern der Klasse 1: (a) Immunfluoreszenz-Anfärbung Formaldehyd-fixierter Chromosomen von D.melanogaster mit S5-Ak von Klon S5/7/7/6. (b) Dasselbe Präparat im Phasenkontrast nach Orceinfärbung.

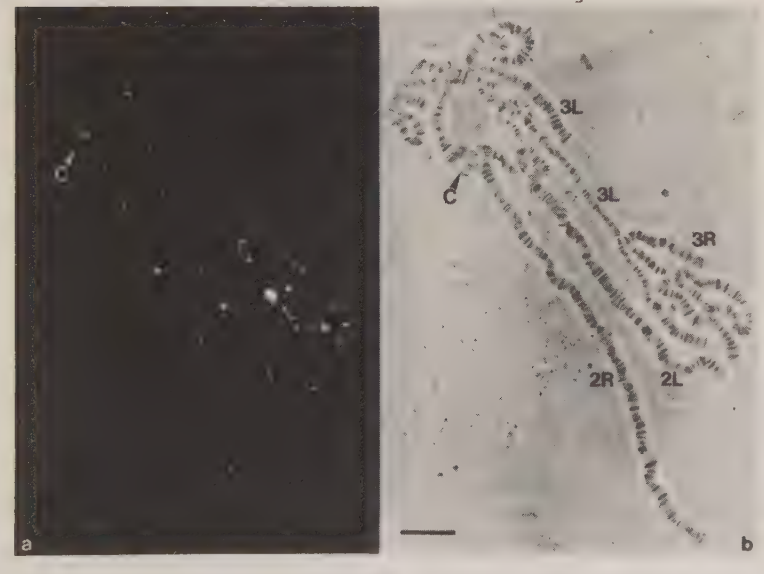


Abb.11 Anfärbung polytäner Chromosomen mit Antikörpern der Klasse 1: (a) Immunfluoreszenz-Anfärbung Formaldehyd-fixierter Chromosomen von D.melanogaster mit T7-Ak von Klon T7/3/6. (b) Dasselbe Präparat im Phasenkontrast nach Orceinfärbung.

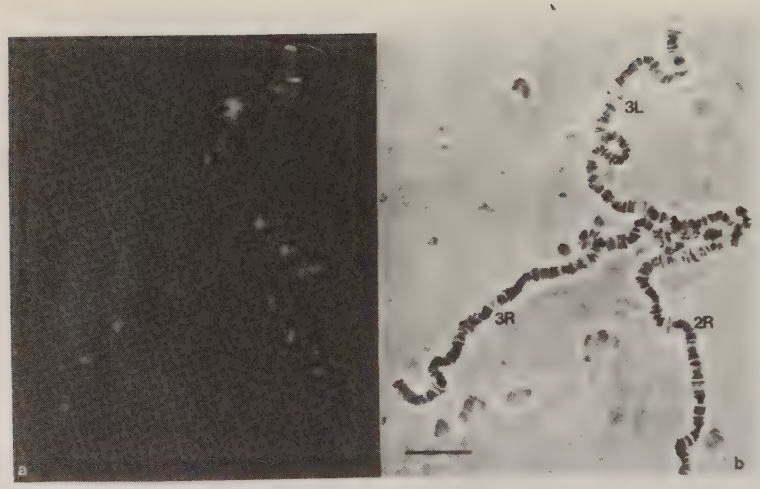


Abb.12 Anfärbung polytäner Chromosomen mit Antikörpern der Klasse 1: (a) Immunfluoreszenz-Anfärbung Formaldehyd-fixierter Chromosomen von D.melanogaster mit V4-Ak von Klon V4/9/6/6. (b) Dasselbe Präparat im Phasenkontrast nach Orceinfärbung.

eine Anfärbung in der indirekten Immunfluoreszenz (Abb.10). Formaldehyd-fixierte Chromosomen von D.hydei und D.virilis wurden (im Gegensatz zu P11-Ak und Q16-Ak) ebenfalls angefärbt.

- T29-Ak von derselben Maus wie S5-Ak, allerdings einer anderen Fusion, zeigte dieselben Eigenschaften wie S5-Ak. Das Molekulargewicht wurde mit der Proteintransfer-Methode ebenfalls zu 70 000 Dalton bestimmt.
- T7-Ak von derselben Maus und derselben Fusion wie T29-Ak, mit einem Antigen vom Molekulargewicht 95 000 Dalton (bestimmt nach Proteintransfer) erwies sich als unempfindlich gegenüber Essigsäurefixierung und zeigte nur mit D.hydei eine leichte Kreuzreaktion. Die selektive Anfärbung des Chromosoms war mit diesem Antikörper

nicht so intensiv wie in den oben erwähnten Fällen (Abb.11).

- V4-Ak (Abb.12) stammt von einer Maus, die mit Hydroxylapatit-Fraktion 5 immunisiert worden war (vgl.Abb.3i,j). Dieser Antikörper zeigte ein in der Intensität schwächer ausgeprägtes selektives Färbeverhalten, keine Färbung von polytänen Chromosomen von D.hydei und D.virilis und keine Färbung Essigsäure-fixierter Chromosomen. Im Gegensatz zu allen übrigen bisher erwähnten Antikörpern der Klasse 1 ist das Chromozentrum eindeutig nicht angefärbt. Das Molekulargewicht des Polypeptidantigens wurde in diesem Fall mit der Proteintransfer-Methode zu 38 000 Dalton bestimmt.

4.3.3.2. Klasse 2: Monoklonale Antikörper gegen Proteine in inaktiven Bereichen (Banden)

Abbildung 13a zeigt die indirekte Immunfluoreszenz-Anfärbung wie sie mit P12-Ak von Klon P12/10/8/6 erhalten wurde (von derselben Maus und derselben Fusion wie P11-Ak). In diesem Fall ist die Fluoreszenz mit Regionen korreliert, die im Phasenkontrast dunkel erscheinen (Banden). Es scheint jedoch keine klare Korrelation der Fluoreszenzintensität zu der im Phasenkontrast (Abb.13b) erscheinenden Dichte einer Bande vorzuliegen, da einige, vornehmlich in Puffregionen liegende, weniger kondensierte Banden eine vergleichsweise überproportional starke Anfärbung aufweisen (vgl.Abb.13c,d). Das Chromozentrum ist ebenfalls angefärbt.

Mit Essigsäure-fixierten Chromosomen von D.melanogaster erhält man keine Fluoreszenzanfärbung mit P12-Ak. D.hydei

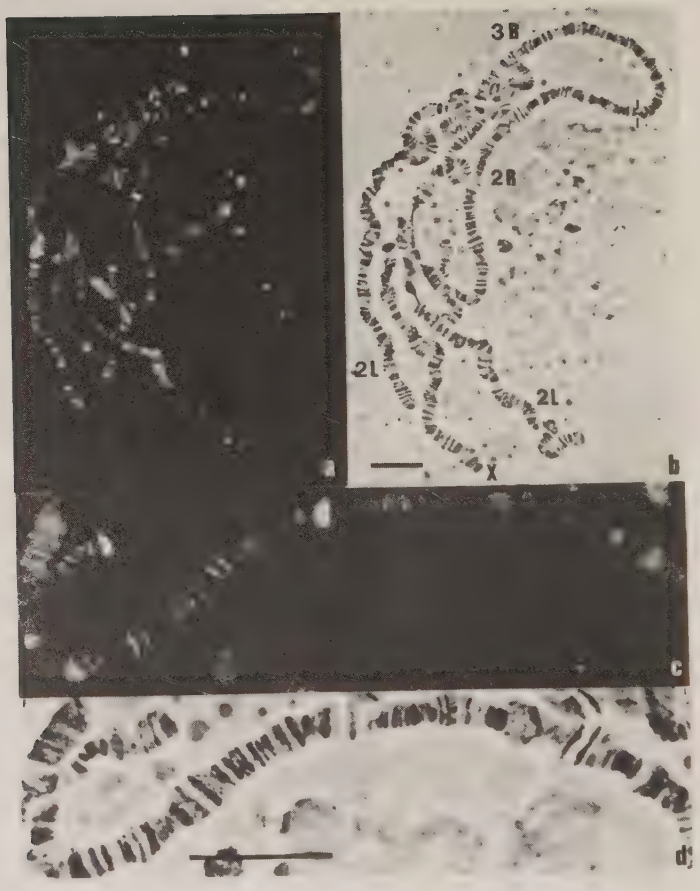


Abb.13 Anfärbung polytäner Chromosomen mit Antikörpern der Klasse 2: (a) Immunfluoreszenz-Anfärbung Formaldehyd-fixierter Chromosomen von D.melanogaster mit P12-Ak von Klon P12/10/8/6. (b) Dasselbe Präparat im Phasenkontrast nach Orceinfärbung. (c), (d) Ausschnitte aus a) und b) kennzeichnen die aneinandergelagerten Enden der Chromosomenarme 3R und 2R.

und D.virilis zeigen in der indirekten Immunfluoreszenz eine schwache Kreuzreaktion.

Als Antigen wurde mit der Proteintransfer-Methode wie auch mit Immunpräzipitation mit KAM-Fab-Sepharose ein Polypeptid von 28 000 Dalton Molekulargewicht bestimmt (vgl. Abb.9c). Es wurde bisher keine weitere Zellinie mit eindeutig demselben Färbeverhalten gefunden.

4.3.3.3. Klasse 3: Monoklonale Antikörper gegen Antigene in Interbanden

Z4-Ak ist in Abb.14a,b als Beispiel für diese Klasse von indirekter Immunfluoreszenzanfärbung gezeigt. Es findet sich eine Aneinanderreihung von fein aufgelösten Linien, die mit Interbandenregionen korreliert sind. Chromozentrum und Puffs sind nur geringfügig angefärbt. Manche Regionen in Puffs sind nicht angefärbt (vgl. Abb.14c,d). Die Anfärbung war gegenüber Essigsäurefixierung stabil. Polytäne Chromosomen von D.hydei und D.virilis zeigten mit diesem Antikörper eine sehr ähnliche Anfärbung. Weder mit der Proteintransfer-Methode noch mit Immunpräzipitation mit KAM-Fab-Sepharose konnte bisher ein Polypeptidantigen nachgewiesen werden. Es fanden sich bei derselben Maus eine Reihe (bisher nicht klonierter) Zellinien, die ein ähnliches Färbeverhalten aufwiesen.

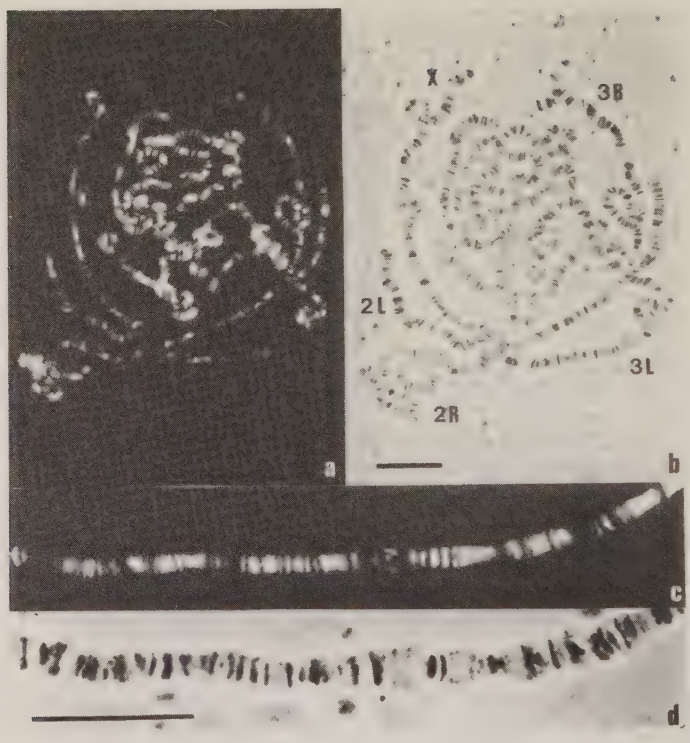


Abb.14 Anfärbung polytäner Chromosomen mit Antikörpern der Klasse 3: (a) Immunfluoreszenzanfärbung Formaldehyd-fixierter Chromosomen von D.melanogaster mit Z4-Ak von Klon Z4/10/9. (b) Dasselbe Präparat im Phasenkontrast nach Orceinfärbung. (c,d) Vergrößerte Darstellung eines Ausschnittes des X-Chromosoms auf demselben Objektträger.

4.3.4. Zusammenfassung der mit monoklonalen Antikörpern erhaltenen Ergebnisse

Die mit den monoklonalen Antikörpern erhaltenen Ergebnisse sind nachfolgend in der Tabelle 4 zusammengefaßt. 12 von 64 in der indirekten Immunfluoreszenz positiven Zellinien wurden kloniert und näher untersucht. Die von den übrigen Zellinien produzierten Antikörper mit deutlich

Tabelle 4 Monoklonale Antikörper gegen Kernproteine von D.melanogaster

Antikörper	Antikörp. Klasse	Immunfluoreszenz-Anfärbung bei Drosophila melanogaster: Kernmembran	Nucleolus	Puffs	Interbanden	Banden	Chromozentrum	Essigsäurefix. Präpar.	Klasse chromos. Färbung	D. hydei	D. viril.	Molekulargew. des Antigens (Daltons)
T4O-Ak	IgG1	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	80 000[1)]
T5O-Ak	IgG1	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	80 000[1)]
U25-Ak	IgG1	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	80 000[1)]
Aj1-Ak	IgG1	-	+	-	-	-	-	n.n.	-	n.n.	n.n.	47 000[2)]
P11-Ak	IgG2a	-	-	+	+	-	+	+	1	-	-	38 000[1)]
Q16-Ak	IgG1	-	-	+	+	-	+	+	1	-	-	38 000[2)]
S5-Ak	IgG1	-	-	+	+	-	+	-	1	+	+	70 000[2)]
T29-Ak	IgG1	-	-	+	+	-	+	-	1	+	+	70 000[2)]
T7-Ak	IgG1	-	-	+	+	-	+	+	1	+	-	95 000[2)]
V4-Ak	IgG1	-	-	+	+	-	-	-	1	-	-	38 000[2)]
P12-Ak	IgG1	-	-	-	-	+	+	-	2	+	+	28 000[1)]
Z4-Ak	IgG1	-	-	±	+	-	±	+	3	+	+	n.n.

Zusammenfassung der Ergebnisse. Die Antikörperklassen wurden nach Ouchterlony und Nilsson (1978) bestimmt. Die indirekte Immunfluoreszenz-Anfärbung wurde, wenn nicht anders erwähnt, an Formaldehyd-fixierten Speicheldrüsenpräparaten durchgeführt. Die Molekulargewichte der Antigene wurden mit 1) der Proteintransfer-Methode und Immunpräzipitation, 2) mit der Proteintransfer-Methode bestimmt. n.n. wurde nicht bestimmt.

positiver Immunfluoreszenz scheinen sich auf den ersten Blick einer der beschriebenen Antikörper-Klassen zuordnen zu lassen. Vor ihrer Klonierung ist jedoch nicht sicher, ob das beobachtete Färbemuster in allen Fällen nur von einem Antikörper stammt, noch ist es auszuschließen, daß eine Untersuchung einer größeren Anzahl von Klonen weitere Antikörperklassen zutage fördern kann.

4. DISKUSSION

In den letzten Jahren wurden immunologische Techniken unter Verwendung der indirekten Immunfluoreszenz mit Erfolg zur Lokalisierung von Proteinantigenen auf Chromosomen der Eukaryonten eingesetzt (Scott und Sommerville, 1974; Alfageme et al., 1976; Silver und Elgin, 1976). Wie in der Einleitung dargelegt, erforderte jedoch die Produktion von spezifischen Antiseren mit hohem Titer bis vor kurzem die Gewinnung von bis zu Milligramm-Mengen äußerst reinen Antigens. Diese Anforderung dürfte besonders schwerwiegende Probleme bei der Suche nach chromosomalen Proteinen mit einer Funktion bei der Regulation der Genexpression schaffen, da diese Proteine nur in äußerst geringen Mengen pro Zelle vorhanden sein sollten, wenn man annimmt, daß für sie ähnliche Funktionsprinzipien gelten wie die bei den Prokaryonten gefundenen (Gilbert und Müller-Hill, 1966; aber vgl. auch Lin und Riggs (1973).

Es schien nun möglich, unter Verwendung der von Köhler und Milstein 1975 entwickelten Methode zur Etablierung klonaler, Antikörper-produzierender Permanentkulturen aus Lymphozyten diese Einschränkungen zu umgehen, da
i) man Proteinmischungen zur Immunisierung verwenden konnte, indem es möglich war, im nachhinein Klone auszuwählen, die Antikörper gegen das Antigen von Interesse produzierten;
ii) die Antigenmenge ein geringeres Problem war, weil keine hohen Serumtiter erforderlich waren, wenn auch das Auffinden eines bestimmten Antikörper-produzierenden Klons gegen seltenere Komponenten Schwierigkeiten berei-

ten konnte. Wäre jedoch ein solcher Klon gefunden, würde der Antikörper in potentiell unbegrenzten Mengen zur Verfügung stehen.

Die hier dargestellten Ergebnisse stellen die Leistungsfähigkeit dieser Methode, insbesondere die Möglichkeit, nach der Verwendung eines Gemisches von Antigenen bei der Immunisierung verschiedene Antikörper gegen Einzelkomponenten auflösen zu können, unter Beweis. Die Versuche hatten nicht zum Ziel, zu bestimmen, mit welcher Häufigkeit sich Antikörper gegen extrem seltene Komponenten finden lassen.

Antigendarstellung

Der Einfachheit halber wurde die Drosophila melanogaster-Zellinie K_c als Antigenquelle verwendet, da daraus genügende Mengen an Kernproteinen für die Fraktionierung und den Radioimmunassay zum Austesten der Zellkulturüberstände zu gewinnen waren. Da diese Zellinie ursprünglich aus embryonalem Gewebe etabliert worden war, bestand allerdings die Möglichkeit, daß dadurch eine Reihe Entwicklungsstadium-spezifischer Antigene mit der indirekten Immunfluoreszenz an Speicheldrüsenchromosomen des dritten Larvenstadiums nicht nachweisbar sein würden.

Da anfangs nicht klar war, wie breit gestreut die Immunantwort unter Verwendung von Gesamt-Kernproteinen sein würde, wurden die Kernproteine fraktioniert. Diese Fraktionierung gewährleistete Unterschiede in der Immunantwort, falls eine der Antigen-Komponenten sich als immunologisch dominant herausstellen sollte, und diente gleichzeitig zur

Anreicherung von Komponenten, die in der Gesamtmischung nur in geringen Konzentrationen vorhanden waren. Diese relative Konzentrierung sollte bei der Immunisierung wie auch bei der späteren Analyse der Antigene (z.B. bei Proteintransfer) von Nutzen sein. Dabei wurde die Methode der Fraktionierung auf Hydroxylapatit hauptsächlich auf Grund ihrer Reproduzierbarkeit benutzt. Ein weiterer Grund war die Vermutung (Bloom und Anderson, 1978), daß das Elutionsverhalten der Kernproteine bei dieser Fraktionierungsprozedur eher von ihrer Bindung aneinander und/oder an die DNS als von ihrer Bindung an Hydroxylapatit abhänge. Somit spiegelt die Auftrennung der Proteine ungefähr deren Bindungsverhalten am Chromatin wider.

Immunantwort

Die Gesamtmischung wie auch die verschiedenen Hydroxylapatit-Fraktionen erwiesen sich nach den Ergebnissen des Radioimmuntests als deutlich immunogen. Eine Ausnahme bildet Hydroxylapatit-Fraktion 3, die hauptsächlich die Histonproteine enthält. Diese sind nur schwach immunogen, wenn sie nicht komplexiert mit Nucleinsäuren immunisiert werden (Stollar, 1978). Die Immunantwort der Tiere im Radioimmuntest konnte um einen Faktor 3 erhöht werden, nachdem die Hydroxylapatit-Fraktion 3 als 1:1-Gemisch mit t-RNA aus Hefe immunisiert worden war (vgl. Abb.3e,f). Austesten von 50-fach verdünnten Antiseren dieser Maus mit der Proteintransfer-Methode ergab dann eine Antigenbande im Molekulargewichtsbereich von Histon H1 (nicht gezeigt).

Beurteilung der Ergebnisse auf der Ebene der Zell-Linien

In einer Reihe von Experimenten (nicht gezeigt) wurde als optimaler Zeitpunkt für die Zellhybridisierung eine Zeit von 3-4 Tagen nach der letzten Injektion bestimmt. Zu dieser Zeit scheint in der Milz der Mäuse die Zahl der zur Fusion geeigneten Lymphozyten maximal zu sein (Claflin und Williams, 1978). Eine Reihe von Schritten bei der Fusion selbst, insbesondere Menge des PEG, Zeitdauer der PEG-Inkubation und Geschwindigkeit des Ausverdünnens der Zellen in PEG-Suspension, scheint, obwohl dies nicht systematisch untersucht wurde, kritisch für das Erreichen hoher Fusionseffizienzen zu sein. Nach Abschluß der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente veröffentlichten Fazekas et al. (1978O) eine Arbeit, in der mehrere die Fusion betreffende Parameter gründlicher untersucht wurden. Mit Ausnahme der Zugabe von Makrophagen zu den Zellkulturen nach der Fusion unterscheiden sich die von Fazekas et al. geschilderten optimalen Bedingungen nicht wesentlich von den in dieser Arbeit in Material und Methoden dargestellten Fusionsbedingungen.

Insgesamt wurden 761 Zellinien etabliert. Dabei waren 45 % positiv im Radioimmuntest; es zeigten jedoch nur 16,5% der getesteten Zellinien-Überstände eine positive Immunfluoreszenz-Anfärbung an polytänen Chromosomen. Für diese offensichtliche Diskrepanz bieten sich mehrere Erklärungen: i) Es handelt sich bei einigen Antigenen um lösliche, nicht strukturgebundene Antigene. Diese wären dann zwar im Radioimmuntest faßbar, nicht aber in der indirekten Immunfluoreszenz.

ii) Es handelt sich um Antigene, die in geringer Kopienzahl pro Zelle vorhanden sind. Diese Antigene wären dann zwar insgesamt mit dem Radioimmuntest noch erfaßbar, ein positives Ergebnis in der indirekten Immunfluoreszenz käme aber nur zustande, wenn sie im Zellkern an bestimmten Stellen stark konzentriert auftreten würden. Auf eine Abschätzung der relativen Sensitivität beider Tests kann hier nicht näher eingegangen werden, da diese sicher für die jeweils betrachtete Antigen-Antikörperkombination im jeweiligen Testsystem unterschiedlich ist (siehe später). Es sei jedoch in diesem Zusammenhang auf den in Material und Methoden dargestellten Bewertungsmaßstab für eine positive Immunfluoreszenz-Färbung verwiesen. Eine ganze Reihe von Zellinien-Überständen zeigte an Chromosomen (und anderen Kernstrukturen) ein Fluoreszenzmuster mit Intensitäten in der Größenordnung des cytoplasmatischen Hintergrundes. Gronemeyer und Pongs(1980) veröffentlichten eine Arbeit, in der die Verteilung des Ecdysons auf polytänen Chromosomen von D.melanogaster mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz dargestellt wurde. In diesem Fall, in dem das Antigen in äußerst geringen Konzentrationen pro spezifischer Stelle vorhanden war, war die Intensität der spezifischen Fluoreszenz in der Größenordnung der Intensität der cytoplasmatischen Anfärbung oder sogar darunter. Es läßt sich somit vermuten, daß sich unter den nach einer ersten Analyse als negativ in der indirekten Immunfluoreszenz eingestuften antikörperhaltigen Überständen auch solche befinden, die Antigene geringer (lokaler) Konzen-

tration erkennen. Mit dieser Vermutung ist dann allerdings für eine weitere Arbeit die Forderung verknüpft, in der indirekten Immunfluoreszenz Methoden zu entwickeln, spezifisch angefärbte Stellen gegenüber unspezifisch angefärbtem Hintergrund erkennen zu können.

iii) Es handelt sich um Antigene, die im Verlauf der bei der indirekten Immunfluoreszenz zur Anwendung kommenden Bedingungen extrahiert, deren antigene Determinanten denaturiert oder zerstört wurden oder die nicht mehr für die Antikörpermoleküle zugänglich waren (siehe dazu Silver und Elgin, 1978b,aber auch Will, 1979).

iv) Es handelt sich um Antigene, die nur bei der Drosophila-Zellinie K_c vorhanden waren, sei es als besondere Eigenheiten dieser Zellinie oder, im interessanteren Fall, als stadiumspezifische Kernproteine der ursprünglich aus embryonalem Gewebe stammenden Zellinie. In beiden Fällen wären diese Antigene mit der indirekten Immunfluoreszenz an polytänen Chromosomen des dritten Larvenstadiums nicht nachweisbar, wohl aber im beschriebenen Standard-Radioimmuntest mit K_c-Gesamt-Kernprotein als Antigen.

v) Es handelt sich bei den Antigenen um (lösliche)cytoplasmatische Verunreinigungen. Diese Möglichkeit ist allerdings als gering einzuschätzen, da die Kerne nach elektronenmikroskopischen Kriterien sehr sauber waren (nicht gezeigt).

Schließlich sei bemerkt, daß die erwähnten Möglichkeiten auch in verschiedenen Kombinationen wirken können.

Obwohl der Radioimmuntest hinreichend sensitiv schien (in einem gereinigten System konnte mit 40ng Antikörper gegenüber 10ng eines Antigens vom Molekulargewicht 20 000 Dalton eine deutlich positive Antwort erzielt werden), war er als alleiniges Testsystem nicht geeignet. Einige in diesem Test negative Zellinien-Überstände zeigten ein deutliches Fluoreszenzmuster an polytänen Chromosomen. Über die Bindungsmechanismen von Proteinen an PVC ist wenig bekannt. Es zeigte sich allerdings, daß das erhaltene Testergebnis bei verschiedenen Antikörpern gegenüber einer Veränderung der Salzbedingungen bei den Inkubationsschritten in unterschiedlicher Weise empfindlich war. Dieser Test wurde daher nur in qualitativer Hinsicht und in Kombination mit der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Wenn allerdings eine positive Korrelation der Ergebnisse beider Tests vorlag, konnte der Radioimmuntest als einfacher Test bei der Verfolgung anschließender Klonierungsschritte eingesetzt werden.

Für die Herstellung von Chromosomenpräparaten für die indirekte Immunfluoreszenz-Anfärbung wurden von anderen Autoren (Silver und Elgin, 1978b; Will, 1979) eine Reihe von verschiedenen Fixierungsbedingungen systematisch untersucht. Für Routinezwecke wurde die in Material und Methoden beschriebene Formaldehydfixierung eingesetzt, die sowohl eine Fixierung der meisten chromosomalen Proteine als auch zufriedenstellende Spreitbarkeit der Chromosomenpräparate gewährleistete. Mögliche Einschränkungen bei der Verwendung dieser Methode wurden bereits diskutiert.

In den beschriebenen 16 Fusionsexperimenten produzierten durchschnittlich 75 % der angesetzten Kulturen Hybride. Unter der Annahme einer erfolgreichen Hybridisierung nach der Poisson-Verteilung dürften dann etwa 46 % der erhaltenen Zellinien klonalen Ursprungs gewesen sein. Außerdem verlieren Hybridzellinien und Klone oft ihre Fähigkeit, Antikörper zu produzieren (Melchers et al., 1978). Obwohl dieses Phänomen nicht vollständig verstanden wird, dürfte ein Chromosomenverlust nach der Fusion und bei folgenden Teilungen dazu beitragen (Margulies et al., 1976; Melchers et al., 1978; Schall und Rechsteiner, 1978). Zweifache Klonierung auf Weichagar stellte in den meisten Fällen sicher, daß man klonale Zellinien erhalten hatte, die stabil waren im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Antikörper zu erzeugen.

Monoklonale Antikörper gegen Kernmembranproteine

Ein Vergleich der Abbildung 3g,h mit der Abbildung 4a,b liefert einen anschaulichen Beweis für das Funktionieren und die Leistungsfähigkeit der monoklonalen Antikörper-Technik. Während im Fall des Serums einer Maus,die mit Hydroxylapatit-Fraktion 4 immunisiert worden war, in der indirekten Immunfluoreszenz sowohl Kernmembran als auch Chromosomen und Nucleolus angefärbt wurden, zeigt der Antikörper eines aus dieser Maus gewonnenen Zellklons nur noch eine Anfärbung der Peripherie des Zellkerns. Es ist keine Anfärbung der Chromosomen festzustellen, und dies ist - wie der direkte Vergleich der Bilder zeigt - keine Folge begrenzter Zugänglichkeit für den Antikörper. (Auch stärker

gequetschte Präparate, bei denen die Chromosomen freilagen, zeigten eine Anfärbung ausschließlich an der Kernmembran.)

Die Tatsache, daß in allen 3 Fällen auch mit Essigsäure fixierte Präparate angefärbt wurden, und die Bedingungen, unter denen die Kerne isoliert wurden, zeigen, daß es sich bei den Antigenen um fest gebundene Membrankomponenten handelt.Polypeptide mit ähnlichen Determinanten konnten in der indirekten Immunfluoreszenz auch bei Speicheldrüsenkernen von Drosophila virilis und Drosophila hydei nachgewiesen werden; Mäusezellen (P3-NS1/1-Ag4-1) zeigten keine Fluoreszenz. Inwieweit diese Komponente bei höheren Organismen konserviert auftritt, wurde nicht weiter untersucht.

Das Molekulargewicht der Antigene wurde ermittelt, indem autoradiographisch die Position der Bande auf einem Nitrocellulose-Abdruck eines SDS-Gels bestimmt wurde, an die die Antikörper gebunden wurden. Da diese Nachweismethode an anderer Stelle detailliert diskutiert wird (Risau, 1980), sei hier nur kurz auf sie eingegangen. Die Methode ist einfach, reproduzierbar und schnell (48 Std). Ein Nachteil liegt vor allem in ihrer im höheren Molekulargewichtsbereich erniedrigten Transfereffizienz (erklärt durch langsamere Diffusion größerer Polypeptide aus dem Gel), obwohl ein Antigen von 95 000 Dalton Molekulargewicht noch gut nachzuweisen war. Eine weitere Einschränkung besteht darin, daß, obwohl viele Antigene nach SDS-Behandlung nachweisbar waren, es unbekannt ist, ob die Antigenizität quanti-

tativ erhalten bleibt. Manche Antigene waren nur nach Zusatzbehandlung, wie der in Material und Methoden beschriebenen Harnstoffbehandlung, nachweisbar; in anderen Fällen konnte selbst nach einer solchen Behandlung kein Antigen nachgewiesen werden.

Mit dieser Methode konnte für alle 3 Antikörper ein Polypeptid-Antigen mit einem Molekulargewicht von 80 000 Dalton nachgewiesen werden. Die nach Lagerung bei -20°C auftretenden Zusatzbanden dürften auf proteolytischen Abbau des Antigens während der Präparation zurückzuführen sein[3]. Eine Fällung des Antigens mit KAM-Fab-Sepharose ergab ebenfalls ein Polypeptidantigen vom Molekulargewicht 80 000 Dalton (und zusätzlich Abbaubanden von niedrigerem Molekulargewicht). Es bleibt zu ermitteln, ob alle 3 Antikörper gegen dasselbe Protein (und dieselbe Determinante) gerichtet sind (siehe später).

Monoklonale Antikörper gegen Antigene des Nucleolus

Im Fall eines gegen den Nucleolus gerichteten Antikörpers zeigte das Mäuseserum dasselbe Färbeverhalten in der indirekten Immunfluoreszenz wie der Kultur-Überstand eines

[3] In einem nicht in dieser Arbeit beschriebenen Test mit der Proteintransfermethode zeigte ein klonaler Zellkulturüberstand 2 Antigenbanden. Da dieses Antigenmuster sich weder unter Verwendung frisch präparierter Kernproteine noch nach weiteren Subklonierungsschritten veränderte, muß davon ausgegangen werden, daß dieser monoklonale Antikörper gegen 2 Proteine mit denselben antigenen Determinanten gerichtet war. Neben anderen Erklärungsmöglichkeiten könnte es sich dabei um stammesgeschichtlich eng verwandte Proteine handeln. Eine alternative Erklärung wäre, daß aus einer Proteinvorstufe die andere Antigenkomponente durch spezifischen Abbau in der Zelle erzeugt wird. In jedem Fall liefert dieses Beispiel jedoch den Hinweis, daß für das Antigen (im Gegensatz zur antigenen Determinante) der Begriff "monoklonal" nicht ohne weiteres gleichzusetzen ist mit dem Begriff "monospezifisch".

von dieser Maus etablierten Zellklons. Während jedoch ein Test des Mäuseserums mit der Proteintransfermethode mehrere Antigenbanden zeigte, wurde der monoklonale Antikörper nur an eine dieser Komponenten, ein Polypeptid-Antigen mit einem Molekulargewicht von 47 000 Dalton, gebunden.

Monoklonale Antikörper gegen chromosomale Proteine

Die in der indirekten Immunfluoreszenz an polytänen Chromosomen mit klonalen Zellkultur-Überständen erhaltenen Färbemuster scheinen in 3 unterscheidbare Klassen zu fallen. In der ersten Klasse konnten auf Grund unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Fixierungsbedingungen, unterschiedliche Kreuzreaktionen mit anderen Drosophila-Spezies und schließlich auf Grund unterschiedlicher Molekulargewichte der Polypeptid-Antigene verschiedene Unterklassen definiert werden. Ein detaillierter Vergleich der Färbemuster zweier verschiedener Antikörper an Drüsen derselben Larve oder zu einem festgelegten Zeitpunkt der Larvalentwicklung wird weitere Unterschiede in den (Unter-) Klassen zutagefördern können und möglicherweise einen Hinweis liefern, inwieweit die verschiedenen Antigene für sich oder zusammen mit anderen Antigenen in einem größeren Komplex am Chromosom vorhanden sind. Die Färbemuster sind jedoch äußerst komplex und ihre detaillierte Analyse würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen. Ich möchte mich daher im weiteren Verlauf der Diskussion auf das allgemeine Erscheinungsbild der Immunfluoreszenzmuster der drei Klassen beschränken. Im Folgenden werden Vergleiche mit Immunfluoreszenzmustern anderer Labors vorgenommen. Da es jedoch schwierig ist, Fixierungs- und Färbebedingungen zu standardisieren,

sollten diese Vergleiche mit Vorsicht behandelt werden.

Antikörper der Klasse 1 färben eine begrenzte Zahl von Stellen einschließlich vieler der sichtbaren Puffs (eine detailliertere Analyse wird zeigen, ob alle von Ashburner, 1972, beschriebenen Puffs angefärbt sind). Obwohl Hinweise darauf deuten, daß Genaktivität nicht nur auf sichtbare Puffs begrenzt ist (Jamrich et al., 1977; Semeshin et al., 1979), sollte der Begriff "Anfärbung von aktiven Bereichen" als vorläufige Beschreibung dieses Färbemusters verstanden werden. Es gibt Hinweise, daß sich einige der Antigene der Klasse 1 in einer Proteinfraktion zusammen mit schnell markierter RNS anreichern lassen und möglicherweise mit den sogenannten RNP-Proteinen identisch sind (Siegfried Kobus ,persönliche Mitteilung). Dennoch färben alle bisher erhaltenen Antikörper der Klasse 1, außer V4-Ak, das Chromozentrum, das nach Meinung einiger Autoren nur geringe Transkriptionsaktivität enthalten soll. Eine ähnliche Anfärbung polytäner Chromosomen von D. melanogaster mit konventionellen Antiseren gegen Proteinfraktionen von D.melanogaster-Embryonenkernen, fraktioniert nach deren Molekulargewicht in SDS-Gelen (Anti-ρ-Muster; Silver und Elgin, 1977) oder nach DNase I-Abbau und EDTA-Extraktion (Anti-Bande 2-Muster; Mayfield et al., 1978) ist in der Literatur beschrieben. In Bezug auf die selektive Anfärbung einer begrenzten Zahl von Stellen, einschließlich der meisten sichtbaren Puffs war das Färbemuster ähnlich der unter Klasse 1 beschriebenen Anfärbung. Das Chromozentrum ist jedoch nach den Autoren nicht angefärbt (bei genauerer Betrachtung des Immunfluoreszenzbildes des Anti-Bande 2-Serums, Mayfield et al., 1978, Abb.2, ist

jedoch eine Anfärbung des Chromozentrums festzustellen. Die Molekulargewichtsbereiche der Antigene lagen im Fall des ρ-Antigens bei 80 000 - 110 000 Dalton, im Fall des Anti-Bande-2-Antigens bei 55 000 - 70 000 Dalton, letzteres also durchaus im Bereich von S5-Ak bzw. T29Ak.

Will und Bautz (1979) berichteten über ein ähnliches Färbemuster mit einem konventionellen Antiserum gegen eine Hydroxylapatitfraktion von D.melanogaster-Embryo-Chromatin (Anti-Fraktion 8). Dieses Serum färbte das Chromozentrum und viele Puffs. Das Serum enthielt mindestens zwei gegen verschiedene Antigene gerichtete Antikörper. Einer davon war gegen ein nahezu ausschließlich im Chromozentrum lokalisiertes Antigen vom Molekulargewicht 38 000 Dalton gerichtet. Für die andere(n) Komponente(n) des Serums konnte nicht entschieden werden, ob die beobachtete Fluoreszenz nur mit Puffs oder mit Puffs und dem Chromozentrum korreliert war. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse legen die Existenz von Proteinen nahe, die sowohl in aktiven Regionen als auch im Chromozentrum gebunden vorkommen

Das Immunfluoreszenzmuster des P12-Ak (Klasse 2) ist korreliert mit den im Phasenkontrast dunkel erscheinenden Banden und dem Chromozentrum. Obwohl es in dieser Hinsicht dem Anti-21/5.22-Muster von Silver und Elgin (1978a) ähnelt, bestehen Unterschiede zwischen beiden Mustern. Silver und Elgin verwendeten ein konventionell hergestelltes Antiserum gegen ein durch präparative 2-dimensionale Auftrennung gewonnenes Polypeptid vom Molekulargewicht 21 000 Dalton mit einem isoelektrischen Punkt von 5.22. Das P12-Ag hat ein Molekulargewicht von 28 000 Dalton. Im Fall der Anfärbung

mit P12-Ak findet man zusätzlich zu einer eher generellen Anfärbung der Banden und des Chromozentrums einige stärker angefärbte Regionen innerhalb kondensierter Bereiche von Puffs, die in den Bildern von Silver und Elgin (1978a) nicht festzustellen sind. Weiterhin berichteten Silver und Elgin von einer starken Reduktion der Anfärbung mit dem Anti21/5.22-Serum bei Formaldehydfixierung, während die P12-Ak-Anfärbung nur an Formaldehydfixierten Präparaten zu beobachten war. Somit ist das P12-Ag sicher verschieden von dem von Silver und Elgin beschriebenen Antigen 21/5.22. Eine mögliche Funktion dieses Proteins, insbesondere die Bedeutung der starken Anfärbung selektiver Stellen in Puffs im Gegensatz zu der eher generellen Bandenfärbung ist noch unverstanden.

Die Antikörper der Klasse 3 zeigen eine Anfärbung vieler Stellen am Chromosom, die mit den im Phasenkontrast hell erscheinenden Stellen zusammenfällt. Interessanterweise werden Puffs oder bestimmte Bereiche von Puffs durch diese Antikörper nicht angefärbt. Dies wirft natürlich die Frage nach der möglichen Funktion dieses Antigens in den Interbanden auf, ist aber gleichzeitig ein Beweis dafür, daß das erhaltene Färbemuster nicht einfach eine Folge erleichterter Zugänglichkeit des Antigens in bestimmten Bereichen ist, sondern tatsächlich dessen spezifische Verteilung widerspiegelt. In mancher Hinsicht ähnelt dieses Muster dem Anti-σ-ϕ-Muster von Mayfield (1978); dies sollte jedoch durch detaillierten Vergleich beider Muster abgesichert werden. Bisher konnte mit der Proteintransfer-Methode in dieser Klasse kein Anti-

gen eindeutig nachgewiesen werden, möglicherweise infolge der für diese Methode diskutierten Einschränkungen. Ebenfalls war bisher mit der Immunpräzipitation durch KAM-Fab-Sepharose kein Antigennachweis möglich. Die Gründe sind in diesem Fall nicht bekannt.

Zusammenfassende Kommentierung der Ergebnisse

Im Zusammenhang gesehen, kann man aus den geschilderten Ergebnissen mehrere generelle Schlußfolgerungen für die Anwendbarkeit der monoklonalen Antikörper-Methode ziehen:

i) Es ist möglich, nach Immunisierung mit Proteingemischen Antikörper gegen einzelne Komponenten dieser Mischungen zu erhalten.

ii) Mit einer gegebenen Proteinmischung ist es möglich, mehrere Antikörper-produzierende Klone gegen einzelne Komponenten der Mischung zu erhalten (z.B. T7-Ak, T29-Ak, T40-Ak stammten von derselben Fusion). Es dürften jedoch aufwendigere Versuchsreihen an vielen Klonen notwendig sein, wenn man nach Komponenten suchte, die aus Gründen ihres molekularen Aufbaus, ihrer Menge oder auf Grund beider Ursachen nur schwach immunogen sind. Eine Anreicherung der Komponenten könnte diesen Nachteil kompensieren.

iii) Die Antigenmenge, die man benötigt, um einen Klon zu etablieren, der potentiell unbegrenzte Antikörpermengen erzeugt, ist minimal. Viele der Antigene der zur Immunisierung verwendeten komplexen Proteingemische waren sicherlich nur in Mikrogrammmengen vorhanden (vgl. Abb.2).

Im speziellen Fall, bei Kernproteinen von D.melanogaster, war es möglich, Antikörper gegen Proteine des Nucleolus, der Kernmembran und der Chromosomen zu erhalten. Letztere konnten nach ihren Immunfluoreszenz-Mustern 3 Klassen zugeordnet werden. Weitere detaillierte Analyse dieser Muster wird möglicherweise zusätzliche Unterklassen zutage fördern. Es sollte möglich sein, Veränderungen in der Verteilung der Antigene nach Veränderungen der Stoffwechsellage des Organismus (Reaktion auf Hitzeschock bzw. Ecdysonbehandlung) und den zeitlichen Ablauf dieser Veränderungen zu verfolgen. Es ist bereits bekannt, daß sich die Fluoreszenzmuster der Antigene der Klasse 1 unter Hitzeschock ändern (Rainer Kabisch, persönliche Mitteilung).

Weiter sollte es möglich sein, mit diesen hochspezifischen monoklonalen Antikörpern die Funktionen der verschiedenen Polypeptid-Antigene herauszufinden. Falls diese Antigene als Proteine bekannter Funktion identifiziert werden können, ist es möglich, die Antikörper als Reagentien zur Isolierung dieser Proteine in ihrem Nativzustand, möglicherweise in einem funktionellen Komplex zusammen mit anderen Proteinen zu verwenden. Andererseits, falls eine Korrelation zwischen der Anwesenheit des Antigens und Genaktivität besteht, könnten die Antikörper als Indikatoren aktiver Gene eines bestimmten Larvalstadiums eingesetzt und, unter geeigneten Bedingungen, zur Isolierung dieser Gene verwendet werden. Schließlich besteht die Möglichkeit, durch Injektion der Antikörper in die Zelle die Funktionen dieser Antigene unter in vivo-Bedingungen zu studieren.

Mein Hauptinteresse besteht in der Funktionsweise regulatorischer Proteine, konkreter zunächst in ihrer Verteilung auf polytänen Chromosomen. Die weitere Arbeit wird erweisen, inwieweit die monoklonale Antikörper-Technik, zusammen mit einer verbesserten Methodik der indirekten Immunfluoreszenz, in der Lage ist, einen Beitrag zur Lösung dieser komplexen Fragestellungen zu leisten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Gereinigte Kerne sowie daraus durch Fraktionierung über Hydroxylapatit gewonnene grobe Kernproteinfraktionen der D.melanogaster-Zellinie K_c wurden zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Aus den Milzen dieser Tiere wurden nach der Methode von Köhler und Milstein (1975) 761 permanente Hybridzellinien etabliert. 344 dieser Zellinien sezernierten Antikörper, die, wie im Radioimmuntest gezeigt werden konnte, gegen Komponenten der zur Immunisierung eingesetzten Antigenmischung gerichtet waren. 64 der im Radioimmuntest positiven Linien sezernierten Antikörper, die in der indirekten Immunfluoreszenz an Speicheldrüsenpräparaten eine deutliche Anfärbung distinkter Kernstrukturen zeigten. 58 Zellinienüberstände zeigten eine spezifische Anfärbung polytäner Chromosomen, 5 färbten die Kernmembran, ein Zellinienüberständ färbte den Nucleolus. 12 der in der indirekten Immunfluoreszenz positiven Zellinien wurden kloniert und die von ihnen sezernierten Antikörper näher charakterisiert. In 11 Fällen konnte das Molekulargewicht des Antigens in SDS-Gelen unter Verwendung einer neuen Proteintransfermethode oder durch Immunpräzipitation ermittelt werden.

7. LITERATUR

Alfageme, C.R., Rudkin, G.T., Cohen, L.H.: Locations of chromosomal proteins in polytene chromosomes. Proc.Natl.Acad.Sci (Wash.) 73, 2038-2042 (1976)

Ashburner, M.: Puffing patterns in Drosophila melanogaster and related species. In: Developmental studies on giant chromosomes (W.Beermann, ed.), pp.101-151, New York: Springer Verlag 1972

Ashburner, M.: Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Dev.Biol.39, 141-157 (1974)

Benyajaiti, C., Worcel, A.: Isolation, characterization and structure of the folded interphase genome of Drosophila melanogaster. Cell 9, 393-407 (1976)

Biessmann, H., Gjerset, R.A., Levy W., B., McCarthy,J.B.: Fidelity of chromatin transcription in vitro. Biochemistry 15, 4356-4363 (1976)

Bloom, K.S., Anderson, J.N.: Fractionation and characterization of chromosomal proteins by the hydroxyapatite dissociation method. J.Biol.Chem.253, 4446-4450 (1978)

Bowen, B., Steinberg, J., Laemmli, U.K., Weintraub H.: The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. Nucl.Ac.Res. 8, 1-20 (1980)

Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem.72, 248-254 (1976)

Claflin, L., Williams, K.: Mouse myeloma-spleen cell hybrids: enhanced hybrdisation frequencies and rapid screening procedures. In: Current Topics in Microbiology and Immunology 81, Lymphocyte Hybridomas (F.Melchers, M.Potter and N.Warner eds.) pp 107-109. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1978

Dulbecco, R., Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J.Exptl.Med.99, 167-182 (1954)

Dulbecco, R., Freeman, G.: Plaque production by the Polyoma virus. Virology 8, 396-397 (1959)

Echalier, G., Ohanessian, A.: In vitro culture of Drosophila melanogaster embryonic cells. In Vitro 6, 162-172 (1970)

Elgin, S.C.R., Bonner, J.: Limited heterogeneity of the major nonhistone chromosomal proteins. Biochemistry 9, 4440-4447 (1970)

Elgin, S.C.R., Bonner, J.: Partial Fractionation and chemical characterization of the major non-histone chromosomal proteins. Biochemistry 11, 772-781 (1972)

Elgin, S.C.R., Weintraub, H.: Chromosomal proteins and chromatin structure. Ann.Rev.Biochem.44, 725-774 (1975)

Fahey, J.L.: Chromatographic separation of immunoglobulins. In: Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol.I (C.A.Williams and N.W.Chase eds.), pp.322-330, New York: Academic Press, 1967

Fazekas, S., Groth, De St., Scheidegger, D.: Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J.Immunol.Meth. 35, 1-21 (1980)

Finch, J.T., Klug, A.: Solenoidal model for superstructure in chromatin. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 73, 743-746 (1977)

Gilbert, W., Müller-Hill, B.: Isolation of the Lac-repressor. Proc.Natl.Acad.Sci. (Wash.) 56, 1891-1898 (1966)

Greenleaf, A.L., Plagens, U., Jamrich, M., Bautz, E.K.F.: RNA polymerase B (or II) in heat induced puffs of Drosophila polytene chromosomes. Chromosoma (Berl.) 65, 127-136 (1978)

Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.: The preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem.J.89, 114-123 (1963)

Gronemeyer, H., Pongs, O.: Localization of ecdysterone on polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Proc.Natl.Acad.Sci. (Wash.) 77, 2108-2112 (1980)

Haemmerling, G.J.: T lymphocyte tissue culture lines produced by cell hybridization. Eur.J.Immunol.7, 743-746 (1977)

Hozier, J., Renz, M., Nehls, P.: Involvement of histone H1 in the organization of the chromosome fiber. Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 74, 1879-1883 (1977)

Jamrich, M., Greenleaf, A.L., Bautz, E.K.F.: Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Proc.Natl.Acad.Sci (Wash.) 74, 2079-2083 (1977)

Kearney, J.F., Radbruch, A., Lisegang, B., Rajewsky, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. J.Immunol.123, 1548-1550 (1979)

Klein, J.: Biology of the mouse histocompatibility-2 complex. Berlin: Springer Verlag 1975

Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497 (1975)

Köhler, G., Howe, S.C., Milstein, C.: Fusion between immunoglobulin secreting and non-secreting myeloma cell lines. Eur.J.Immunol.6, 292-295 (1976)

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970)

Lefevre, G.jr.: A photographic representation and interpretation of the polytene chromosomes of Drosophila melanogaster salivary glands. In: The genetics and biology of Drosophila, Vol.1a (M.Ashburner and C.Novitski eds.) pp.31-66, London: Academic Press, 1976

Lin, S., Riggs, R.D.: The general affinity of Lac-repressor for E.coli DNA: Implications for gene regulation in prokaryotes and eukaryotes. Cell 4, 107-111 (1973)

Littlefield, J.W.: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 145, 709-710 (1964)

March, S.C., Parikh, I., Cuatrecasas, P.: A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal.Biochem.60, 149-152 (1974)

Margulies, D.H., Knehl, W.M., Scharff, M.D.: Somatic cell hybridisation of mouse myeloma cells. Cell 8, 405-415 (1976)

Mayfield, J.E., Serunian, L.A., Silver, L.M., Elgin, S.C.R.: A protein released by DNase I digestion of Drosophila nuclei is preferentially associated with puffs. Cell 14, 539-544 (1978)

Melchers, F., Polter, M., Warner, N.L.: "Preface" In: Current Topics in Microbiology and Immunology 81, "Lymphocyte Hybridomas" (F.Melchers, M.Polter and N.Warner, eds.), pp.IX-XVIII, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1978

Ouchterlony, Ö., Nilsson, L.Å.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir ed.) Vol.1, Chapter 19, pp.19.1-19.44. Oxford: Blackwell Scientific Publications (1978)

Parker, C.S., Roeder, R.G.: Selective and accurate trascription of the Xenopus laevis 5S RNA genes in isolated chromatin by purified RNA polymerase III. Proc.Natl.Acad.Sci. (Wash.) 74, 44-48 (1977)

Paulson, J.R., Laemmli, U.K.: The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. Cell 12, 817-828 (1977)

Peterson, J.L., McConkey, E.H.: Non-histone chromosomal proteins from HeLa cells. J.Biol.Chem. 251, 548-554 (1976)

Plagens, U., Greenleaf, A.L., Bautz, E.K.F.: Distribution of RNA polymerase on Drosophila polytene chromosomes as studied by indirect immunfluorescence. Chromosoma (Berl.) 59, 157-165 (1976)

Pontecorvo, G.: Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. Somatic Cell Genetics 1, 397-400 (1975)

Risau, W.: Verfahren zur Charakterisierung von Antigenen in einer komplexen Mischung. Diplomarbeit Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1980

Schall, D., Rechsteiner, M.: Kinetics of human chromosome loss from 3T3-human hybrid cells. Som.Cell Genetics 4, 661-676 (1978)

Schäfer, W.: Der Mäuse-Inzuchtstamm STU. Entwicklung und Eigenschaften. Z.Naturforsch. 34c, 306-309 (1979)

Schaffner, W., Weissmann, C.: A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. Anal.Biochem. 56, 502-514 (1973)

Scott, S.E.M., Sommerville, J.: Location of nuclear proteins on the chromosomes of newt oocytes. Nature 250, 680-682 (1974)

Semeshin, V.F., Zhimulev, I.F., Belyaeva, E.S.: Electron microscope autoradiographic study on transcriptional activity of Drosophila melanogaster polytene chromosomes. Chromosoma 73, 163-177 (1979)

Silver, L.M., Elgin, S.C.R.: A method for determination of the in situ distribution of chromosomal proteins. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 73, 423-427 (1976)

Silver, L.M., Elgin, S.C.R.: Distribution patterns of three subfractions of Drosophila non-histone chromosomal proteins: Possible correlations with gene activity. Cell 11, 971-983 (1977)

Silver, L.M., Elgin, S.C.R.: Production and characterization of antisera against three individual NHC proteins; a case of a generally distributed NHC protein. Chromosoma (Berl.) 68, 101-114 (1978a)

Silver, L.M., Elgin, S.C.R.: Immunological analysis of protein distributions in Drosophila polytene chromosomes. In: The cell nucleus Vol.V (H.Busch ed.) pp.215-262, New York: Academic Press (1978b)

Sluyterman, L.A.AE.: The activation reaction of papain. Biochim.Biophys.Acta 139, 430-438 (1967)

Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol.98, 503-517 (1975)

Stollar, B.D.: Serological analyses of histones. In: Methods in Cell Biology Vol.XVIII (G.Stein, J.Stein and L.J.Kleinsmith eds.) Chapter 7, pp.105-122. New York: Academic Press, 1978

Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J., Roeder, R.G.: Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promotor in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. Cell 18, 469-484 (1979a)

Weil, P.A., Segall, J., Harris, B., Sun-Yu Ng, Roeder, R.G.: Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates. J.Biol.Chem. 254, 6163-6173 (1979b)

Weisbrod, S., Weintraub, H.: Isolation of actively transcribed nucleosomes using immobilized HMG14 and 17 and an analysis of ∝-globin chromatin. Manuskript abgeschickt.

Will, H.: Immunologische Charakterisierung von Nicht-histonproteinen von Drosophila melanogaster. Inauguraldissertation Rupprecht-Karl-Universität Heidelberg (1979)

Will, H., Bautz, E.K.F.: Immunological identification of a chromocenter associated protein in polytene chromosomes of Drosophila. Exp.Cell Res.125, 401-410 (1980)

Williams, A.F., Galfre, G., Milstein, C.: Analysis of cell surfaces by xenogenic myeloma-hybridoma antibodies: differentiation antigens of rat lymphocytes. Cell 12 663-673 (1977)

LEBENSLAUF

Am 5.7.1949 geboren in Memmingen/Bayern als Kind von Erna Saumweber, geborene Haas, und Heinrich Saumweber, besuchte ich von 1956 - 1960 die Grundschule in Memmingen und in Ravensburg/Baden-Württemberg. Ab 1960 wurde ich am Spohn-Gymnasium in Ravensburg - einem altsprachlichen Gymnasium - weitergebildet, und ich legte dort am 22.6.1968 das Abitur ab. Vom 1.10.1968 bis zum 31.3.1970 war ich dann bei der Bundeswehr verpflichtet. Anschließend immatrikulierte ich mich zum Sommersemester 1970 für das Studienfach Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, an der ich am 16.9.1977 meine Diplomhauptprüfung in Biochemie ablegte. Anfang März 1978 begann ich, am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für Physikalische Biologie, in Tübingen zu arbeiten. An diesem Institut fertigte ich vom 1.12.1978 bis zum 31.5.1980 unter Anleitung von Dr.rer.nat.habil. Manfred Renz die vorliegende Dissertation: "Monoklonale Antikörper gegen Kernproteine von Drosophila melanogaster" an.